

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VANDERLEIA BOTTON

SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS CATALISADA PELA ADIÇÃO DIRETA DE  
SÓLIDO FERMENTADO DE *Rhizopus microsporus* CBPQA 312-07 DRM EM  
SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES

CURITIBA  
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VANDERLEIA BOTTON

SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS CATALISADA PELA ADIÇÃO DIRETA DE  
SÓLIDO FERMENTADO DE *Rhizopus microsporus* CBPQA 312-07 DRM EM  
SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química, sub-área de Química Orgânica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nadia Krieger

CURITIBA  
2014

---

B751s

Botton, Vanderleia

Síntese de ésteres etílicos catalisada pela adição direta de sólido fermentado de *Rhizopus microsporus* CBPQA 312-07 DRM em sistema livre de solventes/ Vanderleia Botton. – Curitiba, 2014.  
140f. : il. color. ; 30 cm.

TeseDissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação em Química, 2014.

Orientador: Nadia Krieger .  
Bibliografia: p. 123-140.

1. Enzimas - Biossíntese. 2. Biodiesel. 3. Fungos fitopatogênicos. 4. Fermentação no estado sólido. 5. Esterificação (Química). I. Universidade Federal do Paraná. II.Krieger, Nadia. III. Título.

CDD: 662.88

---


TERMO DE APROVAÇÃO

**SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS CATALISADA PELA ADIÇÃO DIRETA DE SÓLIDO  
FERMENTADO DE *RHIZOPUS MICROSPORUS* CBPQA 312-07 DRM EM SISTEMA  
LIVRE DE SOLVENTES**

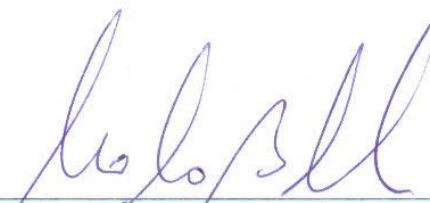
por

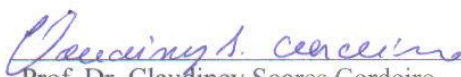
**VANDERLEIA BOTTON**

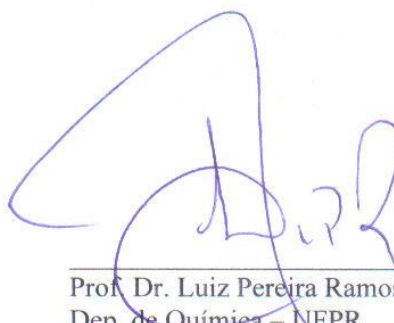
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química, pela Comissão Examinadora composta por:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr.ª Nadia Krieger  
Orientadora  
Dep. de Química – UFPR

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Henry França Meier  
Dep. de Engenharia Química – FURB

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marco Antonio Zachia Ayub  
Dep. de Tecnologia dos Alimentos – UFRGS

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Claudiney Soares Cordeiro  
Dep. de Química – UFPR

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos  
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 31 de outubro de 2014.

Dedico esse trabalho a minha amada família.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pela vida maravilhosa.

À minha orientadora, Professora Nadia Krieger, pela oportunidade e confiança durante o desenvolvimento deste trabalho. Por todos os ensinamentos, críticas e paciência. Por seu incentivo, motivação e amparo com tudo. Obrigada por ter me acolhido em seu laboratório.

Ao professor David Alexander Mitchell, pelas suas valiosas sugestões, por sua colaboração e apoio no desenvolvimento deste trabalho, principalmente na escrita dos artigos.

Ao professor Leandro Piovan pela sua contribuição e atenção na escrita dos artigos.

Aos professores membros das Bancas Examinadoras de Qualificação e de Tese, Claudiney Soares Cordeiro, Henry França Meier, Luiz Fernando de Lima Luz Junior, Luiz Pereira Ramos, Marco Antonio Zachia Ayub e Patricio Guillermo Peralta Zamora, pelo aceite ao convite da avaliação deste trabalho, pela atenção e pelas valiosas contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos meus filhos amados, valentes que são meu orgulho, meus companheiros para toda a vida, Iuri, Jessica e Iasmin, pela sua inteligência, alegria, paciência, independência, incentivo e amor incondicional. Obrigada por tudo nesta vida, por serem tudo para mim.

Ao Fabiano, por seu apoio, paciência, companheirismo, incentivo e imenso bom humor.

Aos meus netos Henrique e Isis pelos momentos de leituras, conversas, descontração, pelos seus sorrisos e amor.

À minha mãe Sebila, pelo seu chimarrão com conselhos sobre saúde, bem estar e fé em Deus, por todo seu carinho e ensinamentos na vida toda.

Aos meus irmãos Claudinara e Hércules e as suas famílias lindas.

A minha irmã pelo seu incentivo em toda a minha vida, por ter sempre me protegido, torcido tanto por mim e me apoiado da melhor maneira possível, obrigada por fazer parte da minha vida eu sei que você estará sempre do meu lado, você é um exemplo para mim.

Aos alunos Fernanda Marchesini, Lucas Carmo e Nicoli Lourenço que colaboraram para a execução deste trabalho. Obrigada pela sua contribuição.

Aos estimados amigos do LTEB e LTEF, Alessandra Baron, Alessandra Biz, Allen, Aline Dutra, Aline Pereira, Christiane, Daniele, Débora, Diniara, Edgar, Fernanda, Glauco, Jonas, Jonathan, Kátia, Liana, Luana, Maribel, Maritza, Maura, Michelle, Mirian, Paulo, Robson e Viviane, pela troca de ideias, consultorias,

reuniões constantes, cafés com doces e amizade. Em especial a Viviane que é uma amiga que me cativou para sempre, obrigada por sua atenção e carinho. Ao Robson que é o meu amigo do coração para todas as horas, começamos juntos os nossos trabalhos. As meninas das pectinases, sempre prontas para ajudar com as ideias inovadoras grande domínio das tecnologias. Jonas, Maritza e Mirian, os meus amigos do Lab. da Química, formamos uma grande parceria e uma amizade que foi fortalecida pela proximidade e troca de muitos mimimis, correções e avaliações de trabalhos, obrigada por toda a sua ajuda sempre espontânea e valiosa. Dini, Aline e Allen, obrigada pela amizade, pelo apoio, pela atenção, pelos ensinamentos com as metodologias do LTEB e pelas discussões sobre os nossos trabalhos e conselhos sobre tudo. Eu levarei vocês todos no meu coração, obrigada pelo seu apoio.

Às meninas Marias, Allen, Aline, Dilamara, Edione, Fernanda, Jaqueline, Priscila, Tatiane, Vanessa e Viviane, pela convivência e amizade.

À Dona Maria que torna a vida das Marias muito mais agradável, organizada e saborosa. Obrigada por todos os seus mimos.

À USDA e a Diniara Soares pela gentil doação da mistura dos ácidos graxos da borra de soja.

À minha querida amiga Dilamara Riva, pelos nossos estudos, pela ajuda e pelos os ensinamentos das análises no CG.

À todos os colegas do NPDEAS, em especial aos professores José Viriato Coelho Vargas e André Mariano. Obrigada por toda a ajuda e colaboração.

À todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química, em especial aos professores Noemi Nagata e Patrício Guillermo Peralta Zamora pela valiosa ajuda com o tratamento estatístico e ao professor Claudiney Soares Cordeiro, por ter acompanhado o desenvolvimento deste trabalho e pela correção dos relatórios anuais e de qualificação. Obrigada por sua atenção e dedicação.

Aos funcionários da Coordenação do Programa de Pós-graduação em Química, Marcelino Câmara e Emilene Alves da Cruz, por sua atenção e apoio.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação Química, professores Luiz Pereira Ramos, Aldo José Gorgatti Zabin, Luiz Humberto Marcolino Junior e Ronilson Vasconcelos Barbosa por toda dedicação e empenho e por tornar possível o desenvolvimento do trabalho de todos.

À professora Lorena Benathar Ballod Tavares da FURB, muito obrigada por seu incentivo e por ter me encaminhado para a professora Nadia Krieger.

Aos professores da Engenharia Química da FURB, que foram incentivadores para que eu escolhesse esta trajetória.

À UFPR e ao Programa de Pós-graduação em Química, pela oportunidade de realizar o meu doutorado em uma instituição tão conceituada.

À CAPES, pela bolsa de doutorado.

À todos que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste trabalho.

“A melhor forma de ter uma boa ideia é ter muitas ideias”

*Linus Pauling*



## RESUMO

A produção do biodiesel em escala industrial é realizada pela transesterificação alcalina em meio homogêneo utilizando alcóxidos metálicos como catalisadores e variando-se o tipo de óleo vegetal de acordo com a região. Neste processo é necessário utilizar óleo com baixo teor de ácidos graxos livres e baixo teor de umidade, o que limita o uso de matérias-primas de baixo custo. Por isto, novos processos têm sido estudados para possibilitar o uso de matérias-primas residuais, como a síntese enzimática de biodiesel tem sido exaustivamente investigada. No entanto, o desenvolvimento e a implantação do processo em escala industrial ainda são dificultados pelo elevado custo da enzima e baixa produtividade do processo enzimático. No presente trabalho, a fermentação em estado sólido (FES) foi utilizada para reduzir o custo das enzimas para a produção de biodiesel. Foram realizados cultivos de *Rhizopus microsporus* CBPQA 312-07 DRM usando bagaço de cana impregnado de solução nutriente enriquecida com ureia, oligoelementos e óleo de soja. Este sólido fermentado foi seco, caracterizado e utilizado diretamente para catalisar a síntese de biodiesel. Nos estudos de esterificação etílica em presença de *n*-heptano, conversões em éster de 98% foram obtidas em 4 h e a conversão se manteve após a reutilização do sólido por 23 vezes. Em sistema livre de solventes, o ácido oleico foi inicialmente utilizado como substrato para o estudo de esterificação etílica, onde foram obtidos 98% de conversão em 48 h, com adição de 20% (m/m) de peneira molecular ao meio de reação. Em seguida, foi realizado um delineamento fatorial 2<sup>2</sup> onde se investigou o efeito da temperatura e da razão molar dos substratos (ácido oleico e mistura de ácidos graxos da borra de soja - AGBS) na esterificação etílica. A reação otimizada, realizada nas condições de razão molar 10:1 (etanol: ácido graxo), a 40 °C, atingiu conversões de 98% e de 86% em 48 h, para o ácido oleico e AGBS, respectivamente. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que foi possível produzir ésteres do biodiesel por esterificação num sistema livre de solventes, utilizando um catalisador produzido por FES a partir de bagaço de cana impregnado com solução nutriente. Essa estratégia minimiza os custos de produção das lipases para aplicação na produção de biodiesel.

Palavras-chave: lipases, biodiesel, *Rhizopus microsporus*, fermentação em estado sólido, esterificação, sistema livre de solventes, síntese enzimática.

## ABSTRACT

Industrially, biodiesel is produced by homogeneous alkaline transesterification of vegetable oils with methanol. An important disadvantage of the chemical route is the need to use refined feedstocks, which are costly. These disadvantages have prompted researchers to study the enzymatic route, which allows the use of less costly residual oils. However, the enzymatic route is currently not competitive, due to the high cost of the lipases. In the present work, solid-state fermentation was used to reduce the cost of the enzyme. *Rhizopus microsporus* CBPQA 312-07 DRM was cultivated on sugarcane bagasse that had been impregnated with a nutrient solution containing urea, mineral salts and soybean oil. The fermented solid produced in this process was dried, characterized and added directly to the reaction medium to catalyze the esterification of oleic acid with ethanol. In the presence of *n*-heptane, conversions of 98% were obtained at 4 h and the fermented solid maintained this conversion in 23 consecutive batches. In solvent-free system with the addition of 20% (w/w) of molecular sieve, a conversion of 98% was obtained in 48 h. Two 2<sup>2</sup> factorial experiments were then carried out in solvent-free medium, one using oleic and one using soybean soapstock fatty acids (SSFA) as the fatty acid source. The variables studied were the reaction temperature and the molar ratio of ethanol to fatty acid. The optimum conditions were 40 °C and a molar ratio of ethanol to fatty acid of 10:1, giving conversions at 48 h of 98% with oleic acid and 86% with SSFA. This work has shown that it is possible to obtain high yields of ethyl esters in a solvent-free medium, using a lower cost fatty acid feedstock and a biological catalyst produced by solid-state fermentation of a nutrient-impregnated sugarcane bagasse. This strategy has the potential to reduce the cost of the enzymatic route for biodiesel production.

**Keywords:** lipases, biodiesel, *Rhizopus microsporus*, solid-state fermentation, esterification, solvent free system, enzymatic synthesis.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DE TRIACILGLICEROL E ÁLCOOL.....	22
FIGURA 2 – REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE TRIACILGLICEROL.....	22
FIGURA 3 – REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DE ÁCIDO GRAXO E ÁLCOOL .....	22
FIGURA 4 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE REFINO DE ÓLEO DE SOJA....	27
FIGURA 5 – MECANISMO REPRESENTATIVO PARA UMA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADA POR LIPASE .....	29
FIGURA 6 – ESTRUTURA DA LIPASE DE <i>Rhizopus oryzae</i> NA PRESENÇA DE TRICAPRILINA.....	31
FIGURA 7 – ETAPAS DE PREPARAÇÃO DE BIOCATALISADORES USADOS NA SÍNTESE DE BIODIESEL .....	42
FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DA ESTRATÉGIA DO TRABALHO.....	51
FIGURA 9 – ETAPAS DOS CULTIVOS EM ESTADO SÓLIDO COM <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM.....	56
FIGURA 10 – COLUNA DE RAIMBAULT ENCAIXADA NO UMIDIFICADOR .....	60
FIGURA 11 – ESQUEMA DO BIORREATOR DE COLUNAS DE RAIMBAULT .....	61
FIGURA 12 – REATOR DE LEITO FIXO PREENCHIDO COM O SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Rhizopus microsporus</i> PARA A SÍNTESE DE BIODIESEL .....	68
FIGURA 13 – CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE LIPASES DURANTE OS CULTIVOS EM ESTADO SÓLIDO DE <i>Rhizopus microsporus</i> .....	76
FIGURA 14 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO DE SOJA NA PRODUÇÃO DE LIPASES EM CULTIVOS NO ESTADO SÓLIDO DE <i>Rhizopus microsporus</i> .....	77
FIGURA 15 – CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE LIPASES DURANTE OS CULTIVOS EM ESTADO SÓLIDO DE <i>Rhizopus microsporus</i> EM COLUNAS DE RAIMBAULT E EM ESTUFA.....	82
FIGURA 16 – FOTOMICROGRAFIA DO BAGAÇO DE CANA (A) ANTES E (B) APÓS OS CULTIVOS DE <i>Rhizopus microsporus</i> (SFBU) .....	87
FIGURA 17 – ESTABILIDADE AO ARMAZENAMENTO DO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Rhizopus microsporus</i> .....	88

FIGURA 18 – EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DE HIDRÓLISE E DE ESTERIFICAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Rhizopus microsporus</i> .....	90
FIGURA 19 – ESTABILIDADE DA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Rhizopus microsporus</i> À TEMPERATURA .....	91
FIGURA 20 – ESTABILIDADE DA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Rhizopus microsporus</i> EM SOLVENTES ORGÂNICOS .....	92
FIGURA 21 – REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADAS PELO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Rhizopus microsporus</i> .....	95
FIGURA 22 – REUTILIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Rhizopus microsporus</i> NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO .....	97
FIGURA 23 – CINÉTICA DE REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADAS PELO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Rhizopus microsporus</i> EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES UTILIZANDO DIFERENTES ÁLCOOIS E ÁCIDO OLEICO .....	98
FIGURA 24 – ATIVIDADE RESIDUAL DO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Rhizopus microsporus</i> DURANTE A CINÉTICA DA REAÇÃO DE SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES .....	101
FIGURA 25 – EFEITO DO TEOR DE ÁGUA NAS REAÇÕES DE SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Rhizopus microsporus</i> EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES .....	102
FIGURA 26 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Rhizopus microsporus</i> .....	109
FIGURA 27 – EFEITO DA RAZÃO MOLAR NAS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADAS PELO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Rhizopus microsporus</i> EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES.....	110
FIGURA 28 – EFEITO DA TEMPERATURA NAS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADAS PELO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Rhizopus microsporus</i> EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES .....	110
FIGURA 29 – EFEITO DA TEMPERATURA NAS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADAS PELO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Rhizopus microsporus</i> EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES EM BIORREATOR DE LEITO FIXO .....	112
FIGURA 30 – REUTILIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Rhizopus microsporus</i> NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM BIORREATOR DE LEITO FIXO .....	114

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ESTUDOS RECENTES SOBRE A PRODUÇÃO DE ÉSTERES CATALISADA POR VIA ENZIMÁTICA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES.....	40
TABELA 2 – ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE ÉSTERES CATALISADA POR SÓLIDOS FERMENTADOS E CÉLULAS INTEIRAS .....	44
TABELA 3 – CARACTERÍSTICAS DA MISTURA DE ÁCIDOS GRAXOS DA BORRA DE SOJA (AGBS).....	52
TABELA 4 – COMPOSIÇÃO DOS SUBSTRATOS UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	54
TABELA 5 – EFEITO DO SUBSTRATO NOS CULTIVOS DE <i>Rhizopus microsporus</i> .....	78
TABELA 6 – ATIVIDADE LIPOLÍTICA DO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Rhizopus microsporus</i> OBTIDO DE DIFERENTES PREPARAÇÕES DO BAGAÇO DE CANA .....	79
TABELA 7 – ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Rhizopus microsporus</i> OBTIDO DE DIFERENTES GRANULOMETRIAS DO SÓLIDO.....	80
TABELA 8 – EFEITO DA SECAGEM NA ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Rhizopus microsporus</i> .....	81
TABELA 9 – ATIVIDADES DE HIDRÓLISE DO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Rhizopus microsporus</i> COM CULTIVOS PRODUZIDOS COM DIFERENTES MASSAS DE SUBSTRATO .....	83
TABELA 10 – UMA SELEÇÃO DE ESTUDOS SOBRE CULTIVOS EM ESTADO SÓLIDO POR FUNGOS E BACTÉRIAS PARA PRODUÇÃO DE LIPASES .....	84
TABELA 11 – DELINEAMENTO FATORIAL 2 <sup>2</sup> APLICADO NA OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Rhizopus microsporus</i> .....	105
TABELA 12 – VALORES DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS PRINCIPAIS E SECUNDÁRIAS DO DELINEAMENTO FATORIAL SOBRE A VARIÁVEL-RESPOSTA CONVERSÃO EM ÉSTER.....	107
TABELA 13 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A CONVERSÃO DO ÁCIDO OLEICO .....	108
TABELA 14 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A CONVERSÃO DA MISTURA DE ÁCIDOS GRAXOS DA BORRA DE SOJA (AGBS) ...	108
TABELA 15 – ESTUDOS DE REUTILIZAÇÃO DE SÓLIDOS FERMENTADOS ....	115
TABELA 16 – ESTUDOS RECENTES DE PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE ÉSTERES CATALISADA POR SÓLIDOS FERMENTADOS .....	117

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	- Ácidos graxos
AGBS	- Mistura de ácidos graxos da borra de soja
AGL	- Ácidos graxos livres
ANOVA	- Análise de variância
ANP	- Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
AOAC	- <i>Association of Official Analytical Chemists</i>
BDA	- Batata, dextrose, ágar
BSP	- <i>Biomass support particle</i>
CEPPA	- Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos
CPQBA	- Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
FAeSTER	- <i>Fatty Acid eSTERification</i>
FAO	- <i>Food and Agricultural Organization of United Nations</i>
FES	- Fermentação em estado sólido
FID	- <i>Flame Ionization Detector</i>
FS	- Fermentação submersa
GRAS	- <i>Generally Regarded as Safe</i>
gSS	- Grama de sólido fermentado seco
Log P	- Logaritmo do coeficiente de partição num sistema bifásico
LTEB	- Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biotecnologia
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura
NPDEAS	- Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Auto-Sustentável
PBR	- <i>Packed Bed Reactor</i>
PNPB	- Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel
pNPP	- <i>p</i> -nitrofenil palmitato
RM	- Razão molar
SF	- Sólido fermentado
SFBG	- Sólido fermentado de bagaço de cana e farelo de semente de girassol
SFBU	- Sólido fermentado de bagaço de cana e uréia
STR	- <i>Stirred Tank Reactor</i>
TAG	- Triacilglicerol

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>20</b>
2.1 BIODIESEL.....	20
2.1.1 Processos de produção de biodiesel.....	21
2.1.2 Matérias-primas para obtenção de biodiesel.....	25
2.2 PRODUÇÃO DE BIODIESEL CATALISADA POR LIPASES .....	27
2.2.1 Lipases - conceito e aplicações .....	27
2.2.2 Características das lipases.....	29
2.2.3 Lipases do fungo <i>Rhizopus microsporus</i> .....	30
2.2.4 Produção de lipases por fermentação em estado sólido.....	32
2.3 ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL CATALISADA POR LIPASES .....	34
2.3.1 Sistemas reacionais .....	34
2.3.2 Variáveis e condições que podem afetar o processo enzimático.....	36
2.3.3 Processos enzimáticos de síntese de biodiesel em escala de bancada em sistema livre de solventes .....	38
2.4 ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR CATÁLISE ENZIMÁTICA USANDO CÉLULAS INTEIRAS E SÓLIDOS FERMENTADOS .....	41
2.5 BIORREATORES PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR CATÁLISE ENZIMÁTICA .....	46
2.6 PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE BIODIESEL POR CATÁLISE ENZIMÁTICA.....	47
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>50</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	50
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	50
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
4.1 ESTRATÉGIA.....	51

4.2 MATERIAIS E REAGENTES.....	52
4.3 PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .....	53
4.3.1 Micro-organismo e preparação do inóculo.....	53
4.3.2 Composição dos substratos sólidos .....	53
4.3.3 Cinética de produção de atividade do sólido fermentado.....	54
4.3.4 Cultivos em estado sólido com a mistura de bagaço de cana e farinha de semente de girassol.....	55
4.3.5 Cultivos em estado sólido com bagaço de cana e solução nutriente.....	55
4.3.6 Efeito da concentração do óleo de soja na produção da atividade de hidrólise e de esterificação do sólido fermentado .....	57
4.3.7 Efeito do substrato nos cultivos de fermentação em estado sólido.....	57
4.3.8 Efeito do pré-tratamento do substrato sólido.....	58
4.3.9 Efeito do tamanho das partículas do sólido .....	58
4.3.10 Efeito da secagem do sólido fermentado.....	58
4.3.11 Cinética da produção de atividade lipolítica em colunas de Raimbault .....	59
4.3.12 Produção do sólido fermentado com diferentes massas de substrato .....	61
4.4 CARACTERIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO .....	62
4.4.1 Estabilidade da atividade lipolítica do sólido fermentado ao armazenamento ..	62
4.4.2 Efeito da temperatura na atividade do sólido fermentado .....	62
4.4.3 Estabilidade da atividade do sólido fermentado em solventes orgânicos .....	63
4.4.4 Especificidade da atividade de esterificação frente a diferentes ácidos graxos	63
4.4.5 Estudo de reutilização do sólido fermentado em reações de esterificação em <i>n</i> -heptano .....	64
4.5 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÉSTERES EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES, EM FRASCOS AGITADOS.....	64
4.5.1 Efeito do comprimento da cadeia do álcool .....	64
4.5.2 Efeito do teor de água.....	65



4.5.3 Otimização da síntese de ésteres etílicos por planejamento fatorial .....	65
4.6 PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES, EM BIORREATOR DE LEITO FIXO .....	67
4.6.1 Estudo de reutilização do sólido fermentado .....	69
4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	69
4.7.1 Determinação da umidade dos substratos e dos sólidos fermentados.....	69
4.7.2 Determinação da atividade de hidrólise .....	69
4.7.3 Determinação da atividade de esterificação .....	70
4.7.4 Determinação de ácidos graxos livres.....	71
4.7.5 Cromatografia em fase gasosa .....	72
4.7.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	74
4.8 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DAS AMOSTRAS .....	74
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
5.1 PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .....	75
5.1.1 Cinética de produção de atividade do sólido fermentado.....	75
5.1.2 Efeito da concentração do óleo de soja na produção da atividade de hidrólise e de esterificação do sólido fermentado .....	77
5.1.3 Efeito do substrato nos cultivos de fermentação em estado sólido.....	78
5.1.4 Efeito do pré-tratamento do substrato sólido.....	78
5.1.5 Efeito do tamanho das partículas do sólido .....	79
5.1.6 Efeito da secagem do sólido fermentado .....	80
5.1.7 Cinética da produção de atividade lipolítica em colunas de Raimbault .....	82
5.1.8 Produção do sólido fermentado com diferentes massas de substrato .....	83
5.2 CARACTERIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO .....	86
5.2.1 Análise do sólido por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	86
5.2.2 Estabilidade da atividade lipolítica do sólido fermentado ao armazenamento ..	87

5.2.3 Efeito da temperatura na atividade do sólido fermentado .....	89
5.2.4 Estabilidade da atividade do sólido fermentado em solventes orgânicos .....	92
5.2.5 Especificidade da atividade de esterificação frente a diferentes ácidos graxos	94
5.2.6 Estudo de reutilização do sólido fermentado em reações de esterificação em <i>n</i> -heptano .....	96
5.3 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÉSTERES EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES, EM FRASCOS AGITADOS .....	97
5.3.1 Efeito do comprimento da cadeia do álcool .....	98
5.3.2 Determinação da atividade residual do sólido fermentado durante a reação de síntese do oleato de etila.....	100
5.3.3 Efeito do teor em água.....	101
5.3.4 Otimização da síntese de ésteres etílicos por planejamento fatorial .....	104
5.4 PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES, EM BIORREATOR DE LEITO FIXO .....	111
5.4.1 Efeito da temperatura.....	111
5.4.2 Estudo de reutilização do sólido fermentado .....	113
5.5. SIGNIFICÂNCIA DOS RESULTADOS DE SÍNTESE ENZIMÁTICA DE BIODIESEL OBTIDOS NESTE TRABALHO .....	116
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>120</b>
<b>7 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>122</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>123</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O biodiesel é uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos carboxílicos de cadeia longa que pode ser produzido pela transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais, ou pela esterificação de ácidos graxos livres, mediante a utilização de catalisadores químicos ou enzimáticos, que podem ser homogêneos ou heterogêneos. O método de síntese química mais comum para a produção do biodiesel em escala industrial é a transesterificação alcalina em meio homogêneo utilizando alcóxidos metálicos como catalisadores e variando-se o tipo de óleo vegetal de acordo com a região. No Brasil, a principal fonte natural de triacilgliceróis para a produção de biodiesel é o óleo de soja.

Embora o processo convencional de catálise alcalina homogênea seja amplamente utilizado por proporcionar rendimentos maiores de 96% em curto tempo (1 h), existem algumas desvantagens relacionadas a ele. Para este processo é necessário usar triacilgliceróis com baixos níveis de umidade ( $< 0,5\%$ ) e de ácidos graxos livres ( $< 1\%$ ), o que limita o uso de matérias-primas de baixo custo. Devido a isto, o custo das matérias-primas refinadas é responsável por 70% a 95% do custo total de produção de biodiesel. Como uma alternativa para a via química, nos últimos anos, o processo de síntese enzimática, que utiliza lipases, vem ganhando importância especial na produção de biodiesel, pois pode partir de matérias-primas residuais que contenham elevados teores de ácidos graxos e água. Além disso, a catálise enzimática apresenta diversas vantagens, como a utilização de condições brandas, biodegradabilidade do catalisador e alta seletividade ao substrato. No entanto, vários desafios permanecem e devem ser superados para aplicação de enzimas para síntese de biodiesel. O alto custo de produção das lipases, sua baixa estabilidade em solventes práticos como etanol e metanol, baixos rendimentos e longos tempos de reação podem limitar o uso deste processo.

Dentro deste contexto, este trabalho propõe o uso de uma nova tecnologia enzimática para a produção de biodiesel, na qual lipases são produzidas em fermentação em estado sólido e o sólido fermentado seco produzido por uma cepa fúngica, *Rhizopus microsporus* CBPQA 312-07 DRM, é utilizado diretamente

como catalisador no processo de esterificação etílica de ácidos graxos em sistema livre de solventes. O estudo deste processo pode contribuir para a viabilização econômica do processo de produção de biodiesel via catálise enzimática.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Países em desenvolvimento, como o Brasil, têm incentivado a produção e o uso de biocombustíveis. Este tipo de iniciativa pode representar uma oportunidade de desenvolvimento rural, além de reduzir a dependência de petróleo, garantindo a segurança energética do país. Dentre os biocombustíveis destaca-se o biodiesel, que é o foco deste trabalho.

### 2.1 BIODIESEL

Segundo a Resolução nº 45, de 25 de agosto de 2014 da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), responsável pela regulação do setor no Brasil, biodiesel é um combustível derivado de biomassa renovável para uso em motores do ciclo diesel, que pode substituir parcial ou totalmente o óleo diesel de origem fóssil. A lei complementa que o biodiesel constitui-se de alquil-ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzidos a partir da transesterificação ou esterificação de matérias graxas, de óleos vegetais ou gorduras de origem animal, e que atenda às especificações contidas na Resolução nº 45 (BRASIL, 2014).

O biodiesel pode ser usado puro ou em mistura com o óleo diesel em qualquer proporção. A concentração do biodiesel é informada por uma nomenclatura definida por BXX, onde XX é a porcentagem em volume do biodiesel que é misturado ao diesel de petróleo. Desta forma, o B2, B5, B20 e B100 são misturas de biodiesel ao diesel, em concentrações de 2%, 5%, 20% e 100% de biodiesel, respectivamente (BRASIL, 2014).

O governo brasileiro criou em 2004 o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), que teve como objetivo a implantação da produção de biodiesel de forma sustentável, com enfoque na inclusão social e no desenvolvimento regional, contribuindo desta forma com a geração de emprego e renda. Em 2005, foi estabelecida a obrigatoriedade da adição de um percentual mínimo de biodiesel ao óleo diesel comercializado, conforme Lei nº 11.097, de

13/01/2005. Esta lei obrigou a adição de um percentual mínimo de 2% de biodiesel ao diesel até 2008 e de 5% até 2013 (BRASIL, 2005). Porém, a Resolução do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) nº 6, de 16/09/09, eleva de 4% para 5%, em volume, o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, de acordo com o disposto na Lei nº 11.097/05, a partir de 01/01/10 (BRASIL, 2009). A partir de 1º de julho de 2014, a Medida Provisória nº 647, de 28/05/14, alterou o percentual obrigatório do biodiesel misturado ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, passando de 5% para 6% (BRASIL, 2014).

O biodiesel é obtido de fonte renovável. Seu emprego em mistura com o óleo diesel confere à mistura melhores características de lubricidade e melhores propriedades combustíveis, como maior número de cetano. Além disso, o uso do biodiesel proporciona menor emissão de monóxido de carbono, enxofre e material particulado durante a combustão e menores emissões dos principais gases do efeito estufa, pois o gás carbônico produzido na sua combustão é quase totalmente fixado durante o cultivo das oleaginosas (CORDEIRO et al., 2011; ZHANG et al., 2003). Há que considerar ainda que o armazenamento e transporte do biodiesel são mais seguros, devido ao seu maior ponto de fulgor, ausência de toxicidade e biodegradabilidade (GIAKOUKIS, 2013; AKOH et al., 2007; VAN GERPEN et al., 2004; JAEGER; EGGERT, 2002).

### 2.1.1 Processos de produção de biodiesel

O principal objetivo do processo da transesterificação de óleos vegetais com álcoois de cadeia curta é reduzir a viscosidade do óleo para um valor próximo ao do diesel (PEREIRA et al., 2007). A reação de transesterificação ocorre entre um éster e um álcool, resultando em um novo éster e um novo álcool por um processo reversível (FIGURA 1), em três etapas sequenciais. Esta reação é também conhecida como alcoólise.

Mais recentemente, vem sendo estudado o processo de hidroesterificação (CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2010), um processo que envolve uma etapa de hidrólise do triacilglicerol (TAG) (FIGURA 2), seguida de esterificação dos ácidos

graxos livres (AGLs) (FIGURA 3). Neste caso, o biodiesel é produzido via reação de esterificação, que ocorre entre um ácido carboxílico e um álcool, formando éster e água, por um processo reversível.

Ambas as reações, transesterificação ou esterificação, podem ser catalisadas por via química com catalisadores homogêneos ou heterogêneos ou via enzimática, onde os catalisadores são as lipases (MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2007).

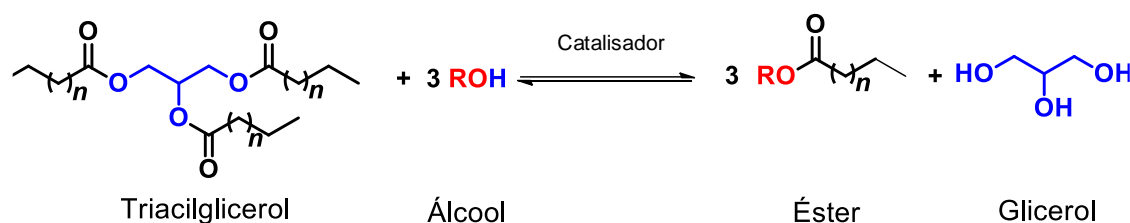


FIGURA 1 – REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DE TRIACILGLICEROL E ÁLCOOL

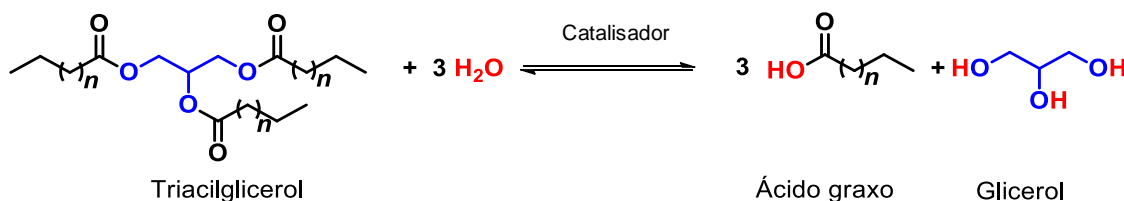


FIGURA 2 – REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE TRIACILGLICEROL

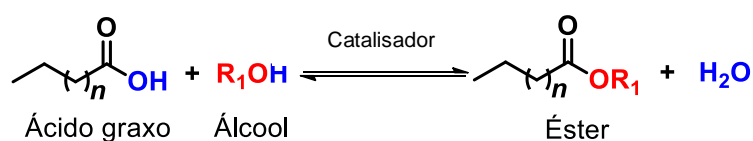


FIGURA 3 – REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DE ÁCIDO GRAXO E ÁLCOOL

A produção de biodiesel em escala industrial é realizada via catálise alcalina homogênea. As condições clássicas descritas para obtenção de biodiesel por transesterificação de TAGs são razão molar 1:6 (TAG: metanol), 0,5 a 1% (m/m) de catalisador alcalino, com relação ao TAG, a temperaturas de 40 a 60 °C, durante 1 h (BANKOVIC-ILIC; STAMENKOVIC; VELJKOVIC, 2012; MATH; KUMAR; CHETTY, 2010; MEHER; SAGAR; NAIK, 2006; FREEDMAN; PRYDE; MOUNTS, 1984). Neste processo, os alcóxidos são catalisadores. Os hidróxidos de metais (KOH e NaOH) são utilizados para gerar o catalisador *in situ* (KUCEK et al., 2007).

O processo implantado na indústria para a produção de biodiesel, transesterificação via catálise em meio alcalino homogêneo, apresenta vantagens econômicas e elevados rendimentos (MOSER, 2009; VAN GERPEN et al., 2004; SCHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998).

Embora o processo convencional de catálise alcalina homogênea seja amplamente utilizado, seus rendimentos em éster são elevados, existem algumas desvantagens relacionadas a ele, como a necessidade de remover o catalisador e o sal formado no final da reação, a recuperação do glicerol e o tratamento de efluentes alcalinos. Além disto, para este processo, é necessário o uso de matérias-primas com baixos níveis de umidade (abaixo de 0,5%) e de ácidos graxos livres (abaixo de 1%). A água pode hidrolisar os TAGs e também os monoésteres graxos, e os ácidos graxos livres consomem o catalisador formando sabão, que, por sua vez, pode emulsionar os produtos dificultando a purificação dos monoésteres e do glicerol (VÉRAS et al., 2011; MA; HANNA, 1999).

Neste sentido, a busca por novas tecnologias para a síntese de biodiesel tem intensificado a publicação de estudos com diferentes matérias-primas e catalisadores para a produção de biodiesel. Neste contexto, a hidroesterificação é uma alternativa ao processo convencional de produção de ésteres etílicos e metílicos, esta estratégia consiste na hidrólise dos triacilgliceróis, seguida da esterificação dos ácidos graxos livres gerados. A hidroesterificação, pois favorece a utilização de matérias-primas de qualquer teor de AGLs e umidade, uma vez que na etapa de hidrólise os TAGs são misturados com água formando glicerol e AGLs. Além disso, por este processo, o glicerol é separado na primeira etapa, não entrando em contato com o álcool, sendo mais puro do que o obtido por transesterificação (SOARES et al., 2013; CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2010).



Entretanto, a dificuldade na recuperação da glicerina é a grande desvantagem deste processo, já que esta sai muito diluída da etapa de hidrólise.

A esterificação dos ácidos graxos obtidos na etapa de hidrólise pode ser catalisada por ácidos ou lipases. A esterificação química é feita normalmente em meio homogêneo com catalisadores ácidos, tais como os ácidos sulfúrico, fosfórico, clorídrico e sulfônico (ZHANG et al., 2009).

Na literatura estão descritos alguns trabalhos de síntese de biodiesel catalisada por ácidos de Brønsted-Lowry. Zhang et al. (2009) realizaram esterificação metílica do ácido oleico utilizando como catalisador o metil sulfonato de N-metil-2-pirrolidona, um ácido de Brønsted e obtiveram rendimentos de 95% quando as esterificações foram conduzidas a 70 °C por 8 h. Han et al. (2009) produziram ésteres metílicos a partir de óleos usados com 35% de índice de acidez. As reações foram catalisadas por um líquido iônico contendo ácido sulfônico  $\text{SO}_3\text{H}$ , um ácido de Brønsted. Obtiveram rendimentos de 93% quando as reações foram realizadas a 170 °C por 4 h.

Industrialmente, o ácido sulfúrico é o mais utilizado devido ao seu baixo custo. No entanto, a recuperação do produto final e do álcool excedente é dispendiosa e requer sucessivas lavagens com água, gerando efluentes ácidos. Além disso, são necessários equipamentos mais resistentes à corrosão causada pelo ácido. Estes problemas podem ser contornados com o uso de catalisadores heterogêneos químicos ou enzimáticos.

A catálise em meio heterogêneo tem como principais vantagens a possibilidade de recuperação e reutilização do catalisador, e a geração de produtos mais puros. Vários catalisadores sólidos ácidos têm sido utilizados para esterificação de AGLs, tais como: óxidos de titânio, zircônio, nióbio, e resinas trocadoras de íons. Geralmente, são utilizadas temperaturas acima de 100°C nas reações (BORGES; DIAZ, 2012). Como alternativa para reduzir a temperatura de trabalho, o uso de enzimas imobilizadas é indicado. As enzimas imobilizadas também atuam em meio heterogêneo e produzem ésteres com elevada pureza. Além das vantagens de atuarem em meio heterogêneo, como comentado anteriormente, as enzimas podem ser produzidas e imobilizadas naturalmente em resíduos agroindustriais, que são biodegradáveis e obtidos a partir de fontes renováveis (SOARES et al., 2013; SALUM et al., 2010; FERNANDES et al., 2007).

### 2.1.2 Matérias-primas para obtenção de biodiesel

O metanol é o álcool mais utilizado no mundo para a produção de biodiesel quimicamente catalisado, devido à sua maior reatividade, atribuída à sua maior polaridade, ao menor custo em relação a outros álcoois e também à melhor separação das fases na purificação do biodiesel. No entanto, comparado ao etanol, este álcool é mais tóxico, tem maior risco de explosão e, em caso de incêndio, forma uma chama invisível, dificultando o controle do fogo. Além disso, o metanol é obtido principalmente a partir de gases derivados do petróleo, de origem fóssil não renovável (ISAYAMA; SAKA, 2008). Por isto, quando o objetivo principal da utilização do biodiesel é a redução na emissão de gases e redução da dependência de combustível fóssil, também é importante avaliar a origem do álcool utilizado.

O etanol é o segundo álcool mais utilizado para a produção de biodiesel; é obtido principalmente por fontes renováveis, sendo o milho e a cana-de-açúcar as matérias-primas mais utilizadas (VÉRAS et al., 2011). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol, mas ainda utiliza principalmente o metanol na produção de biodiesel (RENEWABLE FUELS ASSOCIATION - RFA, 2013). De acordo com a literatura, outros álcoois também podem ser utilizados nas reações de transesterificação e de esterificação para obtenção de biodiesel, como os álcoois primários e secundários, de cadeia ramificada ou linear, com cadeia de 1 a 8 átomos de carbono, como por exemplo 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol e 1-hexanol (YAN et al., 2014; GIRALDO; MORENO-PIRAJÁN, 2012; GOG et al., 2012; GUERRERO; GUERRERO-ROMERO; SIERRA, 2011; STAMENKOVIC, VELICKOVIC, VELJKOVIC, 2011).

As matérias-primas graxas para a produção de biodiesel são óleos vegetais, gordura animal, e óleos e gorduras residuais. De acordo com Giakoumis (2013), as três matérias-primas mais usadas no mundo para a produção de biodiesel são óleos de soja, de canola e de palma. Segundo Christopher, Kumar, Zambareet (2014) estes óleos representam 75% do total de matérias-primas utilizadas mundialmente.

No Brasil, a matéria-prima mais utilizada para a produção de biodiesel é o óleo de soja. Em janeiro de 2014, este óleo foi responsável por 70,9% da

produção de biodiesel, seguido da gordura bovina 24,8%, óleo de algodão 1,9%, óleo de fritura 0,8%, gordura de porco 0,75%, outros materiais graxos 0,7%, óleo de palma/dendê 0,2% e gordura de frango 0,02% (ANP, 2014). Segundo Balat (2011), o custo das matérias-primas refinadas com baixo índice de acidez é responsável por 70 a 95% do custo total de produção de biodiesel. Neste sentido, a matéria-prima para a produção de biodiesel deve ser avaliada com relação ao custo, qualidade dos produtos e rendimento. Por este motivo, a aplicação de matérias-primas alternativas, como óleos ou gorduras residuais, óleo de microalgas, óleos não-refinados, e óleos não-comestíveis para a produção de ésteres tem recebido um interesse considerável em várias abordagens de pesquisa (MEIER et al., 2015; SOARES et al., 2013; ADACHI et al., 2013; BOTTON et al., 2012; LI et al., 2012; JANAUN; ELLIS, 2010; LI; XU; WU, 2007).

As possíveis fontes de óleos e gorduras residuais podem ser os locais nos quais se processam frituras de alimentos, os esgotos, onde o material sobrenadante é rico em material graxo e águas residuais resultante dos processos de indústrias de alimentos, como os frigoríficos. Outros materiais graxos de baixo custo podem ser utilizados para o processo de produção de biodiesel, como é o caso da borra ácida, conhecida como *soapstock*, que é um subproduto proveniente do processo de refino de óleos vegetais (FIGURA 4) e representa cerca de 6% do volume total de óleo bruto processado (HAAS; BLOOMER; SCOTT, 2000). A borra concentrada, conhecida como óleo ácido da borra, contém entre 85-95% de matéria graxa saponificável, sendo composta geralmente por 59% de ácidos graxos livres, 28% de TAGs, 5% de di- e monoacilgliceróis e um percentual de substâncias não graxas (HAAS et al., 2003). De acordo com Haas (2005) e Haas, Bloomer e Scott (2000), o valor comercial da borra bruta é um décimo do valor do óleo de soja refinado e o valor do óleo ácido da borra concentrada é de aproximadamente a metade do valor do óleo refinado.

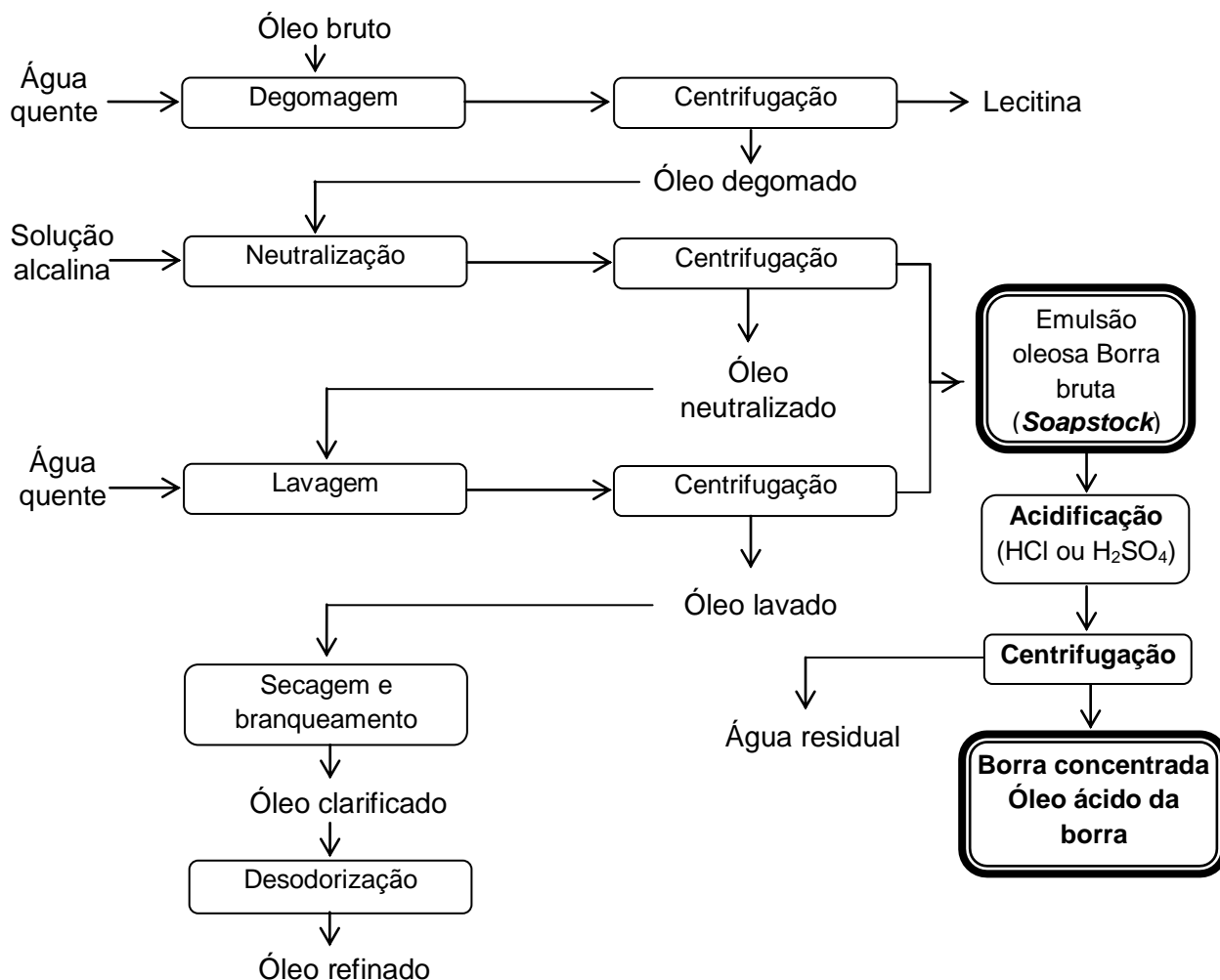


FIGURA 4 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE REFINO DE ÓLEO DE SOJA

FONTE: adaptado de Moretto e Fett (1998)

## 2.2 PRODUÇÃO DE BIODIESEL CATALISADA POR LIPASES

### 2.2.1 Lipases - conceito e aplicações

Lipases (glicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3) são definidas classicamente como carboxilesterases e atuam sobre as ligações éster em meio aquoso hidrolisando acilgliceróis com cadeia carbônica com mais de dez átomos de carbono. Em ambientes aquo-restritos, ou seja, em solventes orgânicos, as lipases promovem a síntese de ésteres (SOARES et al., 2012; FABER, 2011;

KRIEGER et al., 2004; JAEGER; REETZ, 1998; JAEGER et al., 1994). De acordo com Diaz et al. (2006) e Foresti e Ferreira (2005), as lipases vêm sendo aplicadas em diversas áreas devido às suas vantagens em comparação com catalisadores químicos: mostram alta seletividade, atuam em condições brandas e são biodegradáveis.

As lipases pertencem a um grupo especial de esterases classificadas como serina hidrolases. O dobramento das lipases é do tipo  $\alpha/\beta$  hidrolase, que apresenta um núcleo central formado por uma folha  $\beta$  central, consistindo de oito diferentes fitas  $\beta$  anti-paralelas ( $\beta 1$ - $\beta 8$ ), conectadas por cinco  $\alpha$ -hélices (A-F) (BORNSCHEUER, 2002; POUDEROYEN et al., 2001). O nucleófilo catalítico (serina) encontra-se em um pentapeptídeo conservado com uma sequência consenso (Gly-X-Ser-X-Gly) localizada no lado C-terminal da fita 5, onde X representa qualquer um dos 20 aminoácidos (CYGLER; SCHRAG, 1997; JAEGER et al., 1994). O sítio ativo da maioria das lipases é protegido por uma cadeia peptídica hidrofóbica denominada *flap* ou *lid* (tampa). Em meios aquosos, sem um substrato hidrofóbico, a *lid* cobre o sítio catalítico da lipase, que fica inativo. Na presença de substratos hidrofóbicos, as lipases são adsorvidas na interface hidrofóbica, ocasionando mudanças na sua estrutura, expondo o sítio ativo e ativando a enzima (JAEGER; DIJSTRA; REETZ, 1999).

O mecanismo catalítico proposto para a esterificação de um ácido graxo catalisada por lipase está mostrado na FIGURA 5. O sítio ativo das lipases é composto pelos resíduos His, Ser e Asp (histidina, serina e ácido aspártico), contendo os grupamentos imidazólico da histidina, hidroxila da serina e carboxila do ácido aspártico. Estes três resíduos formam a tríade catalítica e juntos atuam na transferência de um grupo acil para serina. A histidina aumenta a nucleofilicidade do grupo hidroxila da serina do sítio ativo catalítico. O oxigênio da hidroxila serínica provoca um ataque nucleofílico ao carbono da cadeia do substrato, formando um intermediário tetraédrico. O intermediário tetraédrico expulsa o íon alcóxido ( $-OR'$ ), que é transferido para o substrato. A partir da transferência de um próton do resíduo de histidina, a água é formada. Na esterificação, o álcool ataca novamente o carbono, ao mesmo tempo em que é desprotonado pelo resíduo de histidina, originando outro intermediário tetraédrico (acil-enzima) (não representado na FIGURA 5). Este complexo libera o éster e a enzima é regenerada (FABER, 2011).

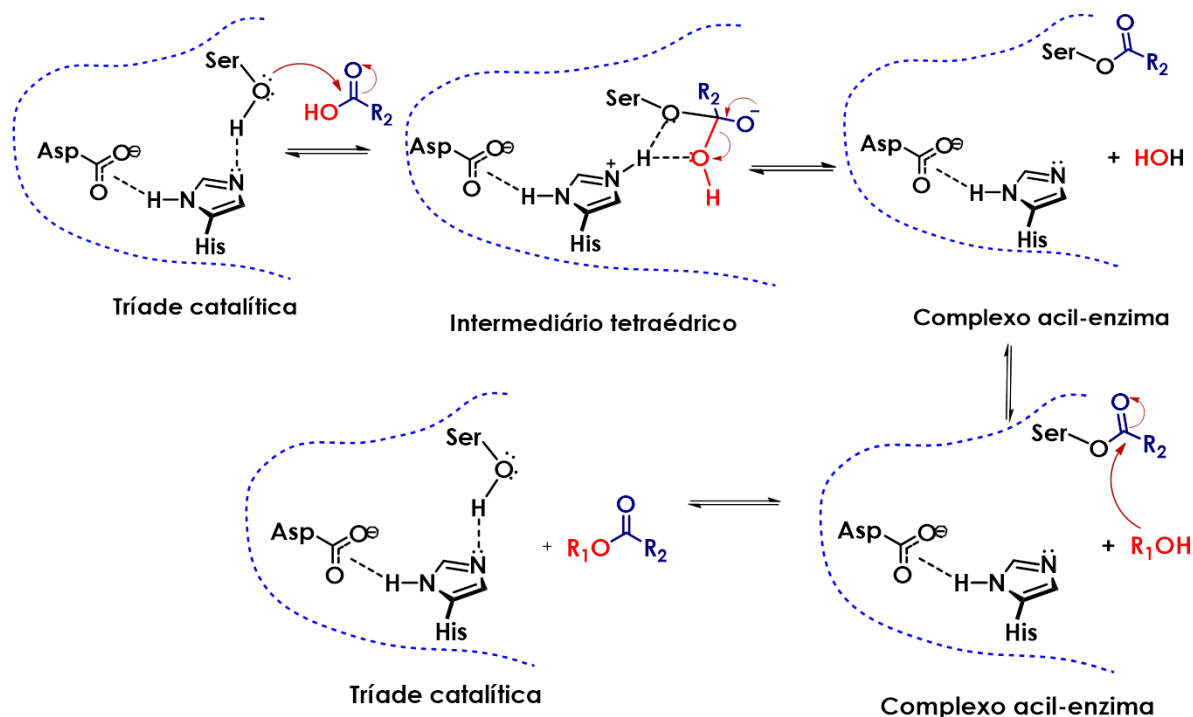


FIGURA 5 – MECANISMO REPRESENTATIVO PARA UMA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADA POR LIPASE

FONTE: Faber (2011).

As lipases são comumente encontradas na natureza podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004). As lipases obtidas de micro-organismos, fungos e bactérias, são as mais utilizadas em processos industriais pela facilidade de manipulação genética e pela facilidade de produção devido ao rápido crescimento dos micro-organismos. A produção de enzimas por via microbiana também permite fácil controle das condições de cultivo e pode ser realizada em escala industrial (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; JAEGER; REETZ, 1998).

### 2.2.2 Características das lipases

As aplicações industriais de lipases microbianas advêm de suas propriedades, como atividade em amplo intervalo de pH (3,0 a 11,0) e temperatura (30 a 60 °C) e sua não dependência de cofatores (GUPTA; GUPTA;

RATHI, 2004). Neste sentido, as características e as propriedades físico-químicas das lipases microbianas apresentam heterogeneidade, como especificidade em presença de diferentes substratos, estabilidade em pH, temperatura ótima e solventes orgânicos. Estas propriedades variam entre os gêneros e até entre as isoformas produzidas pelo mesmo micro-organismo.

A especificidade de uma lipase está relacionada com as propriedades moleculares da enzima, como a estrutura do substrato e com fatores que afetam a ligação enzima-substrato. A especificidade da enzima pode ser classificada em relação: (a) ao substrato - uma enzima apresenta diferentes velocidades de reação de hidrólise entre triacil-, diacil- e monoacilgliceróis; (b) à regiosseletividade - as enzimas hidrolisam ligações ésteres de acordo com a posição na molécula, podendo ser *sn*-1,3 ou *sn*-1,2 específicas, ou aleatoriamente em qualquer ligação (não específicas); (c) aos ácidos graxos que compõem o substrato - preferência por ácidos graxos com comprimentos de cadeia e graus de insaturação específicos; (d) à estereosseletividade - discriminação entre enantiômeros em misturas racêmicas. As lipases podem também ser não seletivas ou apresentar a combinação de mais de um tipo de especificidade (FABER, 2011; JENSEN; GALLUZZO; BUSH, 1990).

### 2.2.3 Lipases do fungo *Rhizopus microsporus*

*Rhizopus* pertence ao gênero dos fungos filamentosos, que têm sua aplicação em processos fermentativos para produção de alimentos e na produção industrial de enzimas. O gênero *Rhizopus* é classificado quanto à sua morfologia e temperatura máxima de crescimento (SCHIPPER, 1984), o fungo da espécie *R. microsporus*, utilizado neste trabalho, é classificado como termotolerante, pois cresce em temperaturas de 30 a 45 °C (KITPREECHAVANICH et al., 2008). Um fungo é considerado termotolerante quando sua temperatura de crescimento máximo é de cerca de 50 °C, podendo se desenvolver também a 20 °C (COONEY; EMERSON, 1964).

Na FIGURA 6 está mostrada a estrutura da lipase de *Rhizopus oryzae*, obtida por modelagem por homologia com outras sequências de lipases.

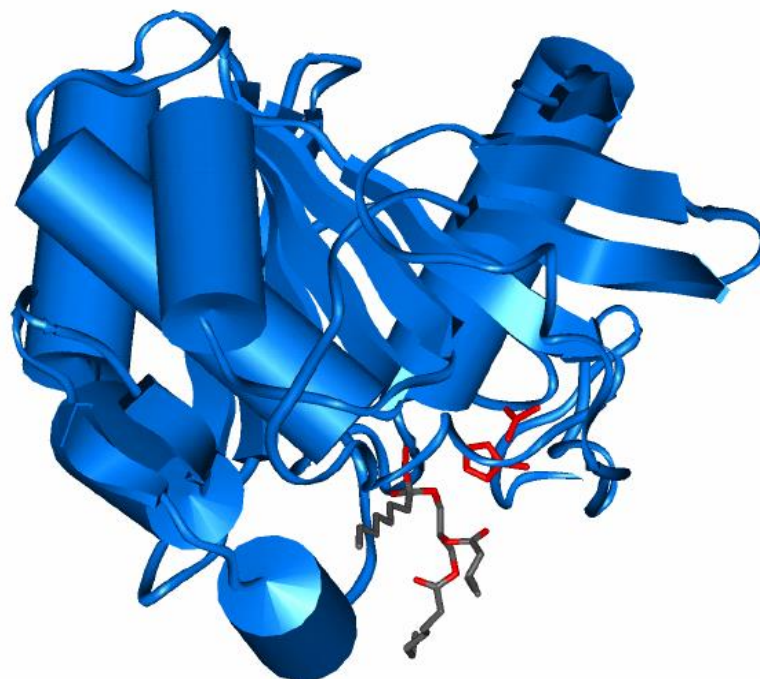


FIGURA 6 – ESTRUTURA DA LIPASE DE *Rhizopus oryzae* NA PRESENÇA DE TRICAPRILINA

FONTE: Diaz (2005).

As lipases dos fungos pertencentes ao gênero *Rhizopus* são mais ativas na faixa de pH entre 7,5 a 8,5 e nas temperaturas de 30 a 40 °C e são estáveis a temperaturas de 50 °C e em valores de pH entre 4,5 e 8,0 (SUN; XU; WANG, 2009; DIAZ et al., 2006; HIOL et al., 2000; ESSAMRI; DEYRIS; COMEAU, 1998). Quanto à especificidade, as enzimas desses fungos são 1,3-específicas na hidrólise e esterificação de glicerídeos (SUN; XU; WANG, 2009; DIAZ et al., 2006; HIOL et al., 2000; ESSAMRI; DEYRIS; COMEAU, 1998).

Os fungos filamentosos produzem diferentes tipos de enzimas, dentre elas lipases de diferentes massas moleculares, que são intracelulares ou extracelulares. As propriedades genéticas e bioquímicas destes fungos têm sido investigadas, mas o mecanismo de secreção ainda não é claro. Diyorov et al. (1994) cultivaram duas cepas de *Rhizopus microsporus* UzLT-4B e UzLT-5C e relataram que a primeira secretou lipases de 32, 66 e 98 kDa e a segunda secretou lipases de 45 e 69 kDa, respectivamente, no mesmo meio de cultura.



A cepa de *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM foi utilizada anteriormente em outros estudos de fermentação em estado sólido (FES). Alberton et al. (2010) obtiveram atividade lipolítica máxima do sólido fermentado na temperatura de 50 °C, e comprovaram a eficiência da ação do sólido fermentado produzido por este fungo na hidrólise e na remoção de lipídeos de efluente de indústria de laticínios, onde foi constatado remoção de 83% de óleos e gorduras após 72 h de tratamento com o sólido fermentado. Sólidos fermentados produzidos por fungos do gênero *Rhizopus* sp. também foram utilizados diretamente em reações de esterificação e transesterificação (ZAGO et al., 2014; ZAGO, 2010). Zago et al. (2014) produziram um sólido fermentado de *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM a partir de uma mistura de bagaço de cana e farinha de semente de girassol (1:1, m/m) com 80% de umidade (m/m) na FES a 40 °C por 18 h, e obtiveram 91% de conversão do óleo de milho em 48 h em *n*-heptano e 68% de conversão do óleo de milho em 72 h em sistema livre de solventes. Em reações de esterificação em frascos agitados foram obtidos 98% de conversão em 3 h, em meio reacional contendo 210 mmol L<sup>-1</sup> de etanol e 70 mmol L<sup>-1</sup> de ácido oleico (razão molar 3:1) em 15 mL de *n*-heptano, a 30 °C e 180 rpm (ZAGO, 2010).

A utilização de micro-organismos considerados GRAS (“Generally Recognised as Safe”), como o *Rhizopus microsporus*, para a produção de sólidos fermentados, é recomendável, uma vez que pode facilitar o aumento de escala dos processos, tanto de produção dos sólidos por FES, como de produção de biodiesel.

#### 2.2.4 Produção de lipases por fermentação em estado sólido

As enzimas microbianas são tradicionalmente obtidas por fermentação submersa (FS), mas a técnica de fermentação em estado sólido (FES) vem sendo amplamente estudada nos últimos anos (ZAGO et al., 2014; LIU et al., 2014; ZAWADZKI et al., 2013; SOARES et al., 2013; LIU et al., 2013; RASERA et al., 2012; ALBERTON et al., 2010; SALUM et al., 2010; SINGHANIA et al., 2009; FERNANDES et al., 2007; NAGY et al., 2006; PANDEY et al., 1999).

A FES é o cultivo de micro-organismos sobre partículas sólidas úmidas na ausência de água livre visível e os espaços entre as partículas são preenchidos com ar. O micro-organismo pode crescer entre os fragmentos do substrato ou sobre a sua superfície, consumindo o substrato e secretando enzimas e metabólitos (MITCHELL et al., 2006; PANDEY, 2003). Os substratos sólidos para os cultivos podem ser resíduos agroindustriais. Os principais resíduos que podem ser utilizados como substratos em FES, para a produção de lipases, são as tortas originadas dos processos de extração do óleo de sementes (milho, girassol e soja) e bagaços da indústria de processamento do amido, da cana-de-açúcar ou de cítricos. De acordo com a *Food and Agricultural Organization of United Nations* (FAO), em 2013, o Brasil processou cerca de 671 milhões de toneladas de cana, que geraram aproximadamente 167 milhões de toneladas de bagaço (FAO, 2013).

Os fungos filamentosos, tais como *Rhizopus*, são importantes micro-organismos utilizados na FES. Devido à sua capacidade de tolerar ambientes com baixa atividade de água, os fungos são mais adequados ao crescimento no estado sólido do que as bactérias (SINGHANIA et al., 2009; COUTO; SANROMÁN, 2006). Entretanto, trabalhos de Liu et al. (2014), Liu et al. (2013), Soares et al. (2013), Salum et al. (2010) e Fernandes et al. (2007) têm provado que culturas bacterianas cultivadas por FES podem resultar em produções de lipases bastante ativas.

As vantagens da FES, quando comparada com a FS, são o baixo custo das matérias-primas empregadas no meio de cultivo, no caso de utilização de resíduos agroindustriais, a simplicidade do processo e a menor demanda energética (MITCHELL; VON MEIEN; KRIEGER, 2003). Castilho et al. (2000) realizaram uma análise econômica comparativa dos processos de FS e FES para a produção de lipases por *Penicillium restrictum*. Essa análise mostrou que, para uma planta produzindo 100 m<sup>3</sup> de concentrado de enzima por ano, o processo por FS requer um investimento de capital 78% maior do que o processo por FES. Além disso, o sólido fermentado pode ser utilizado diretamente em reações, sem a necessidade de etapas de extração e imobilização da enzima.

## 2.3 ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL CATALISADA POR LIPASES

### 2.3.1 Sistemas reacionais

A catálise enzimática pode ser realizada em diferentes tipos de sistemas reacionais. Estes sistemas podem ser classificados em: (1) aquoso; (2) sistema aquoso-orgânico monofásico-água mais solvente orgânico miscível em água; (3) sistema aquoso-orgânico bifásico-água mais solvente orgânico imiscível em água; (4) sistema orgânico monofásico (pode ter um teor mínimo de água); (5) anidro; (6) micelas reversas; (7) sistema livre de solventes; (8) fase gasosa; e (9) líquidos iônicos (10) fluidos supercríticos (FABER, 2011; KRIEGER et al., 2004; KRISHNA; KARANTH, 2002).

Os principais sistemas utilizados como meios reacionais para produção enzimática de ésteres de biodiesel são: (1) sistema em presença de solventes exógenos, que não são substratos da enzima; e (2) sistema livre de solventes, onde o meio reacional é composto apenas pelos substratos da reação. Nos itens seguintes, são descritos em mais detalhes os meios e sistemas reacionais que tiveram mais importância no presente trabalho.

#### 2.3.1.1 Sistema com solventes orgânicos

Ao contrário de muitas outras enzimas, as lipases têm mostrado altos níveis de atividade e estabilidade em meios não-aquosos (DIAZ et al., 2006). Assim, elas têm sido muito utilizadas em reações de síntese nestes meios devido às vantagens que eles possuem em relação aos meios aquosos: a fácil recuperação dos substratos e produtos devido ao baixo ponto de ebulição da maioria dos solventes, a possibilidade de solubilização de substratos hidrofóbicos, o deslocamento do equilíbrio termodinâmico a favor das reações de síntese, a possibilidade de ativação da enzima e aumento de sua estabilidade, a eliminação da possibilidade de reações laterais causadas pela água e a proteção contra

contaminação microbiana (SOARES et al., 2013; FABER, 2011; KRIEGER et al., 2004).

Os solventes mais utilizados são os que possuem valores altos do parâmetro logaritmo do coeficiente de partição ( $\log P$ ), como *n*-hexano ( $\log P = 3,5$ ) e *n*-heptano ( $\log P = 4,0$ ). O  $\log P$  é uma medida da hidrofobicidade do solvente, sendo que, quanto mais alto o valor de  $\log P$ , mais hidrofóbico é o solvente (ZAKS; KLIBANOV, 1988; LAANE; BOEREN; VEEGER, 1987). A adição de um solvente hidrofóbico em reação catalisada por enzima aumenta a solubilidade dos substratos hidrofóbicos e mantém a camada essencial de água que é requerida para a manutenção da sua atividade catalítica (HAMA; KONDO, 2013; KRIEGER et al., 2004; KRISHNA; KARANTH, 2002). Por outro lado, os solventes são tóxicos e inflamáveis e resultam em etapas adicionais para separação do produto (FORESTI; FERREIRA, 2005); devido a isso, em processos como a síntese de biodiesel, sistemas com solventes não são recomendados.

#### 2.3.1.2 Sistema livre de solventes

No sistema livre de solventes, o meio reacional é constituído apenas pelos substratos da reação e o biocatalisador (GIRALDO et al., 2007; FORESTI; ALIMENTI; FERREIRA, 2005). Neste sistema, evita-se a etapa de purificação ou evaporação do solvente e o uso dos substratos em altas concentrações aumenta a produtividade e, consequentemente, reduz o custo do processo biocatalisado (QIN et al., 2008). Além disto, torna este processo menos impactante para o meio ambiente. Porém, nos sistemas livres de solventes tem-se o aumento da viscosidade do meio reacional e a diminuição da atividade e da estabilidade enzimática, devido à inativação da enzima pelos substratos, que nestes sistemas estão presentes em altas concentrações (HALLING, 1990; HALLING 1984). Esta inativação é causada principalmente quando são utilizados álcoois mono hidroxilados de cadeia curta (metanol e etanol), que podem interagir com a camada essencial de água que envolve a enzima, alterando sua conformação ativa (ANTCZAK et al., 2009; SALIS et al., 2008; SHIMADA et al., 2002; KAIEDA et al., 2001). As moléculas de água apresentam maior afinidade pela ligação com

o álcool do que com a enzima e, essa desidratação da enzima pelo álcool diminui sua flexibilidade conformacional, uma vez que a água serve como uma espécie de lubrificante da estrutura da enzima (FABER, 2011; STRAATHOF; ADLERCREUTZ, 2000). O mecanismo de inativação da enzima também pode ocorrer por inibição competitiva, onde moléculas do álcool se ligam reversivelmente ao sítio ativo da enzima, impedindo o acesso do substrato hidrofóbico (NOUREDDINI; GAO; PHILKANA, 2005). Adição do álcool em etapas tem sido utilizada como estratégia para minimizar os efeitos inibitórios do álcool na catálise enzimática (ZAGO et al., 2014; TAN et al., 2010; MADALOZZO, 2010; HAMA et al., 2007).

### 2.3.2 Variáveis e condições que podem afetar o processo enzimático

Dentre os fatores que podem afetar o processo enzimático estão a natureza da enzima, as propriedades da enzima, as técnicas de imobilização de enzimas e de células inteiras, o pré-tratamento enzimático, a quantidade de enzima no meio reacional, razão molar entre os reagentes, os substratos utilizados, o tipo de álcool, uso de solvente na reação, quantidade de água adicionada ao meio, a temperatura da reação e as condições operacionais (HAMA; KONDO, 2013; FABER, 2011).

#### 2.3.2.1 Efeito da concentração dos substratos

A razão molar dos substratos é uma variável de grande influência na síntese de biodiesel. A razão estequiométrica da reação de esterificação é de 1:1 (álcool: ácido graxo) e para a transesterificação é de 3:1 (álcool:óleo). Porém, em alguns casos, utiliza-se um excesso de álcool a fim de assegurar uma alta velocidade de reação e minimizar as limitações de difusão dos substratos (SHIMADA et al., 2002). Entretanto, como já mencionado antes, álcoois de cadeia curta, como metanol e etanol, podem perturbar a estrutura funcional da enzima

por retirar sua camada de “água essencial” enquanto que os álcoois de cadeia longa podem não produzir o mesmo efeito.

Visto que álcoois de cadeia longa têm maior solubilidade no meio reacional, (ácido graxo ou triacilglicerol) e são mais compatíveis com enzimas, têm certas vantagens sobre o metanol, especialmente no processo enzimático e podem não produzir o mesmo efeito de desnaturação e inibição competitiva (YAN et al., 2014). Além disso, os álcoois de cadeias maiores são usados para se obter o biodiesel com propriedades superiores a baixas temperaturas, como por exemplo, menor cristalização, sendo que parte do custo adicional de um álcool de maior cadeia carbônica pode ser compensado pelo ganho com aumento da massa do biodiesel (NIELSEN; BRASK; FJERBAEK, 2008).

Os álcoois de cadeia curta são mais usados na produção de biodiesel. Por isso, é importante encontrar enzimas que se mantenham estáveis a estes substratos em sistemas livre de solventes (YAN et al., 2014; KODA et al., 2010).

#### 2.3.2.2 Efeito da temperatura

A temperatura é um fator que afeta consideravelmente a velocidade de reação catalisada por enzimas por dois mecanismos distintos: o mecanismo químico, onde a velocidade de reação aumenta com a temperatura pelo aumento da energia cinética dos reagentes (substratos) e pelo aumento da transferência de massa, e o mecanismo associado à desnaturação da enzima pelo aumento da temperatura. Esta tendência foi observada em todos os estudos que investigaram o efeito da temperatura sobre a produção de biodiesel por lipases. A temperatura ideal para lipases na reação de transesterificação, onde a desnaturação da enzima ainda é baixa e a atividade catalítica é alta, foi determinada como sendo da ordem de 40 °C (AL-ZUHAIR; LIG; JUN, 2007; NOUREDDINI; GAO; PHILKANA, 2005; FUKUDA; KONDO; NODA, 2001). Entretanto, a temperatura depende em grande parte da enzima e de suas características de atividade e estabilidade à temperatura e em solventes orgânicos, sendo difícil de generalizar.

### 2.3.2.3 Efeito da água

Nas reações catalisadas por lipases, em meios não aquosos, alguma quantidade de água é necessária para manter a enzima ativa. As moléculas de água são essenciais porque elas promovem interações que permitem o dobramento da proteína em sua estrutura tridimensional nativa, cataliticamente ativa. Consequentemente, qualquer modificação nesta camada de hidratação pode promover uma redução da atividade enzimática (FORESTI et al., 2007). À medida que se aumenta o teor de água, a reação pode ter seu equilíbrio deslocado no sentido da hidrólise, que começa a competir com síntese, tanto na esterificação quanto na transesterificação (NOUREDDINI; GAO; PHILKANA, 2005). Por outro lado, alguns autores acrescentam água diretamente no meio reacional de esterificação para remover a água formada durante a reação, aumentando assim a conversão em éster. No caso de adição de água nos sistemas reacionais de esterificação, em teores mais elevados de água, o sistema se torna bifásico e a água produzida na reação de esterificação migra para a fase aquosa. Uma vez removida a água do meio reacional orgânico, o equilíbrio da reação é deslocado no sentido da síntese (SOARES, 2014; ATADASHI et al., 2012; FORESTI et al., 2007). De acordo com Fjerbaek, Christensen e Norddahl (2009) a quantidade de água ideal deve ser avaliado para cada lipase no que diz respeito ao rendimento ótimo, esta quantidade de água requerida para a máxima atividade depende também da polaridade do solvente utilizado: quanto mais hidrofílico for o solvente, mais água será necessária para atingir a atividade ótima. Isto indica que no caso dos solventes mais hidrofílicos, a enzima e o solvente competem pelas moléculas de água.

### 2.3.3 Processos enzimáticos de síntese de biodiesel em escala de bancada em sistema livre de solventes

Os estudos de processos enzimáticos para a produção de biodiesel abrangem alguns avanços tecnológicos obtidos em reações de esterificação e transesterificação. Estes estudos, em sua grande maioria, visam reduzir os custos

das enzimas e melhorar a economia de processo global com vistas a produção em larga escala de biodiesel por via enzimática. Os principais obstáculos que impedem a produção industrial de biodiesel por catálise enzimática são o custo das enzimas e a baixa eficiência de conversão e além disso, a instabilidade da enzima uma vez isolada do meio natural e exposta às condições reacionais. Devido a estes obstáculos, a maioria dos estudos descritos na literatura limita-se à escala de bancada.

A fim de minimizar problemas da baixa estabilidade do biocatalisador, uma das estratégias é o processo de imobilização (HAMA; KONDO, 2013). O maior desafio é o de selecionar uma técnica de imobilização que permita a atividade máxima da lipase, maior retenção de atividade no suporte e maior estabilidade durante a reação. As técnicas de imobilização consistem em aprisionamento, cross-linking e adsorção (LEE; LIN; MOU, 2009). De acordo com Christopher, Kumar, Zambareet (2014), as enzimas imobilizadas comerciais mais frequentemente utilizadas são a lipase B de *C. antarctica*, imobilizada em resina acrílica (Novozyme<sup>®</sup> 435), a lipase de *Mucor miehei*, imobilizada em resina macroporosa de troca iônica (Lipozyme IM), a lipase de *T. lanuginosus* imobilizada em resina acrílica (Lipozyme TLIM), a lipase de *Rhizomucor miehei*, imobilizada em resina de troca aniônica macroporosa (Lipozyme RM IM).

Uma grande variedade de biocatalisadores tem sido aplicada na produção de biodiesel (TABELA 1). Observa-se que a eficiência de conversão da catálise enzimática é influenciada por fatores tais como a fonte e as propriedades das lipases, as técnicas de imobilização, os pré-tratamentos enzimáticos, os substratos e os solventes utilizados. Em reações de transesterificação foram relatadas conversões de 70 a 100%. Autores como Yücel (2012) recorreram ao uso de água diretamente no meio de reação a fim de proteger a enzima da desnaturação pelo álcool. O autor realizou a metanólise de óleo de oliva e relatou que 1% de água (m/v) foi favorável para a obtenção de conversão máxima de biodiesel. Porém, observou que houve uma diminuição gradual da conversão quando o teor de água foi superior a 1%, o que pode ser devido ao efeito da hidrólise dos triacilgliceróis. Nas reações de esterificação em sistema livre de solventes, foram relatadas conversões em éster de 15 a 96%. Nestes estudos o ácido oleico, de grau analítico, obtido comercialmente é comumente utilizado por ser um ácido graxo presente em grande quantidade na maioria dos TAGs.



TABELA 1 – ESTUDOS RECENTES SOBRE A PRODUÇÃO DE ÉSTERES CATALISADA POR VIA ENZIMÁTICA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES

	Micro-organismo produtor da lipase/Suporte	AG ou TAG/ Álcool	Conversão/ Tempo	Referência
Esterificação	<i>Aspergillus oryzae</i> recombinante/espuma de poliuretano	AG óleo de soja ou palma/ metanol	90 a 93%/10 h	Adachi et al. (2013)
	<i>Yarrowia lipolytica</i> /tecido não tecido	AG de óleo de soja/ etanol	85%/3 h	Meng et al. (2011)
	<i>Candida rugosa</i> e Novozyme <sup>®</sup> 435/resina acrílica	AG*/ metanol	96%/24 h	Watanabe et al. (2007)
	<i>Candida</i> sp. 99-125/ membrana têxtil	ácido oleico/ metanol, etanol, <i>n</i> -propanol <i>n</i> -butanol	15% 82% 83% 88%/ 24 h	Zhong et al. (2013)
Transesterificação	<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11/Accurel <sup>®</sup> EP 100	óleo de mamona/ etanol	90%/6 h	Baron et al. (2014)
	<i>Proteus mirabilis</i> /evolução dirigida/Immobead	óleo de canola/ metanol	100%/20 h	Korman et al. (2013)
	<i>Burkholderia</i> sp./partículas magnéticas	óleo de oliva/ metanol	70%/12 h	Liu et al. (2012)
	<i>Penicillium camembertii</i> KCCM 11268 e <i>Candida rugosa</i> /silica gel/cross-linking	óleo de palma/ metanol	99%/5 h	Malilas et al. (2013)
	<i>Thermomyces lanuginosus</i> / sílica porosa	óleo de soja/ etanol	70%/10 h	Rodrigues et al. (2010)
	<i>Aspergillus oryzae</i> recombinante/espuma de poliuretano	óleo de soja e canola/ metanol	96%/14 h	Yoshida et al. (2012)
	<i>Thermomyces lanuginosus</i> / bagaço de azeitona ativado com poliglutaraldeído	óleo de oliva/metanol	93%/24 h	Yücel (2012)

\*óleo ácido de refino das oleaginosas.

Percebe-se um grande aumento nos estudos de esterificação com misturas de ácidos graxos obtidos pela hidrólise dos TAG, como nos trabalhos de Adachi et al. (2013), Meng et al. (2011) e Watanabe et al. (2007). Estes autores descrevem estudos do processo de hidroesterificação (hidrólise dos TAGs seguida de esterificação dos AGs). Esta é uma alternativa para o uso de matérias graxas residuais ou de baixo custo, com altos teores de AGL e água.

Nestes trabalhos, a comparação com os estudos de esterificação e transesterificação fica difícil devido à grande variedade dos substratos e biocatalisadores usados, assim como às técnicas de imobilização e também as técnicas de produção enzimática, como as enzimas obtidas por evolução dirigida. Outro fator que deve ser destacado é a falta de informações sobre a concentração ou sobre as atividades das enzimas utilizadas nos trabalhos.

Na literatura também estão descritos estudos em que os autores utilizaram solventes hidrofóbicos nas reações de síntese de biodiesel, como Madalozzo et al. (2014) e Baron et al. (2011), que utilizaram *n*-heptano na esterificação etílica do ácido oleico. Liu et al. (2011) usaram líquidos iônicos e Lee et al. (2011) usaram o fluido supercrítico de CO<sub>2</sub> para a síntese de ésteres metílicos. Nestes sistemas, a transferência de massa entre os substratos é mais eficiente, mas o custo do processo torna-se muito alto comparado ao sistema livre de solventes (SOTOFT et al., 2010). Portanto, para a produção de biodiesel é interessante utilizar sistema livre de solventes.

## 2.4 ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR CATÁLISE ENZIMÁTICA USANDO CÉLULAS INTEIRAS E SÓLIDOS FERMENTADOS

Muitas etapas estão envolvidas na preparação das lipases imobilizadas, tais como o isolamento e a purificação das lipases (requerida em alguns casos) e os pré-tratamentos de alguns suportes (FIGURA 7). Na tentativa de evitar as etapas complexas de recuperação, purificação e imobilização de lipases, muitos estudos têm investigado o uso de células inteiras (YAN; ZHENG; LI, 2014; YOSHIDA et al., 2012; PAZOUKI et al., 2010) e de sólidos fermentados com atividade lipolítica (ZAGO et al., 2014; AGUIEIRAS et al., 2014; LIU et al., 2014; SOARES et al., 2013; SALUM et al., 2010; FERNANDES et al., 2007).

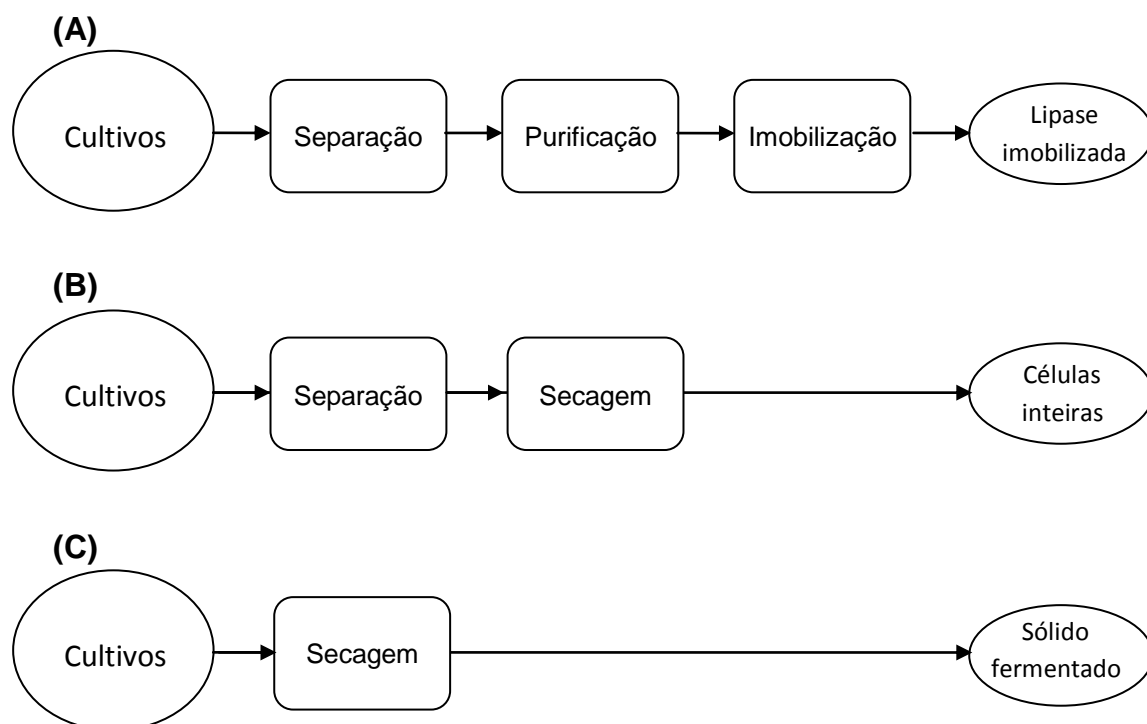


FIGURA 7 – ETAPAS DE PREPARAÇÃO DE BIOCATALISADORES USADOS NA SÍNTESE DE BIODIESEL

(A) Lipase imobilizada; (B) Células inteiras; (C) Sólido fermentado.

As metodologias de produção de células inteiras e sólidos fermentados com atividade lipolítica são alternativas menos dispendiosas para usar na produção de biodiesel por via enzimática (FIGURA 7). Nestes casos, menos etapas são necessárias para produzir as lipases. Consequentemente, isto pode reduzir significativamente o custo do processo de produção de biodiesel.

Fungos e bactérias foram utilizados para a produção de sólido fermentado e células inteiras utilizados na síntese de ésteres (TABELA 2). Foram utilizadas células inteiras de micro-organismos liofilizadas ou imobilizadas em partículas de poliuretano (ADACHI et al., 2013; HUANG et al., 2012; QIN et al., 2008; MATSUMOTO et al., 2001). Matsumoto et al. (2001) desenvolveram os biocatalisadores de células inteiras com *R. oryzae* com secagem ao ar. Estas células inteiras com 2% (m/v) de tampão acetato (pH 7,0) 0,1 mol L<sup>-1</sup> foram utilizadas na metanólise do óleo de soja com conversão de 71% em 165 h. A partir deste trabalho, muitos outros estudos foram realizados, com objetivo de reduzir os custos com os biocatalisadores comerciais.

Para a transesterificação em sistema livre de solventes, as conversões variaram de 68 a 96%, em sistema com solventes variaram de 83 a 95% (TABELA 2), enquanto que, para reações de esterificação, as conversões variaram de 12 a 97%. As conversões obtidas em sistemas com solventes não são comparáveis entre si e nem com as conversões obtidas em sistema livre de solventes, pois, no primeiro caso, as concentrações dos substratos são muito menores e podem variar grandemente entre os trabalhos citados na literatura.

Em nosso grupo, os estudos iniciais com o sólido fermentado de *B. cepacia* LTEB11 foram feitos em presença de *n*-heptano. No trabalho pioneiro de Fernandes et al. (2007), a conversão foi de 95% em 120 h para a transesterificação do óleo de milho e para a esterificação etílica do ácido oleico, usando o mesmo biocatalisador, os autores obtiveram conversão de 94% em 18 h. A partir deste trabalho, foram realizados estudos em sistemas livre de solventes, como relatado a seguir. Comparando-se o processo de esterificação com a transesterificação em sistema livre de solventes catalisado pelo sólido fermentado de *B. cepacia* LTEB11, no trabalho de Soares et al. (2013), na esterificação etílica de AGBS em biorreator de leito fixo, verifica-se que o tempo total de reação para a máxima conversão foi significativamente menor (31 h) do que o da transesterificação relatado por Salum et al. (2010), para a etanólise de óleo de soja, no mesmo tipo de biorreator. No estudo de Zago et al. (2014), que motivou o presente trabalho, os autores utilizaram um sólido fermentado por *R. microsporus* CPQBA 312-07 DRM para a etanólise do óleo de milho e relataram uma conversão de 68% em 72 h. Na esterificação etílica do ácido oleico, Zago (2010) obteve apenas 12% de conversão em 3 h.

TABELA 2 - ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE ÉSTERES CATALISADA POR SÓLIDOS FERMENTADOS E CÉLULAS INTEIRAS (CONTINUA)

	Micro-organismo produtor da lipase	Preparado Enzimático/Suporte	AG ou TAG/Álcool	Solvente	Conversão/Tempo	Referência
	<i>Candida antarctica</i> B (r-CALB)	biomass support particle (BSP)	AG de óleo de palma e soja/metanol	livre	90%/6 h	Adachi et al. (2013)
	<i>Serratia marcescens</i> YXJ-1002	células inteiras	AG de caixa de gordura/metanol	livre	97%/72 h	Li et al. (2012)
	<i>Rhizopus</i> sp.	perlita	ácido oleico/etanol	<i>n</i> -hexano	98%/1 h	Martínez-Ruiz et al. (2008)
Esterificação	<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	bagaço de cana e farelo de semente de girassol	ácido oleico/etanol	<i>n</i> -hexano	92%/8 h	Soares et al. (2013)
	<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	bagaço de cana e farelo de semente de girassol	ácido oleico/etanol	livre	82%/88 h	Soares et al. (2013)
	<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	bagaço de cana e farelo de semente de girassol	AGBS/etanol	livre	92%/31 h	Soares et al. (2013)
	<i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM	bagaço de cana e farelo de semente de girassol	ácido oleico/etanol	<i>n</i> -heptano	98%/3 h	Zago (2010)
	<i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM	bagaço de cana e farelo de semente de girassol	ácido oleico/etanol	livre	12%/3 h	Zago (2010)

TABELA 2 - ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE ÉSTERES CATALISADA POR SÓLIDOS FERMENTADOS E CÉLULAS INTEIRAS (CONCLUSÃO)

	Micro-organismo produtor da lipase	Preparado Enzimático/Suporte	AG ou TAG/ Álcool	Solvente	Conversão/ Tempo	Referência
Transesterificação	<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	farelo de milho	óleo de milho/ etanol	<i>n</i> -heptano	95%/120 h	Fernandes et al. (2007)
	<i>Rhizopus oryzae</i>	células inteiras liofilizadas	óleo de canola/ etanol	livre	70%/144 h	Ciudad et al. (2011)
	<i>Rhizomucor miehei</i> recombinante	células inteiras liofilizadas	óleo de soja/ metanol	<i>iso</i> -octano	83%/72 h	Huang et al. (2012)
	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	bagaço de cana e farelo de semente de girassol	óleo de soja/ etanol	<i>terc</i> -butanol	91%/96 h	Liu et al. (2014)
	<i>Rhizopus oryzae</i> (rROL)	células inteiras secas ao ar	óleo de soja/ metanol	livre/ tampão acetato	71%/165 h	Matsumoto et al. (2001)
	<i>Rhizopus chinensis</i>	células inteiras liofilizadas	óleo de soja/ metanol	livre	96%/24 h	Qin et al. (2008)
	<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	bagaço de cana e farelo de semente de girassol	óleo de soja/ etanol	livre	95%/46 h	Salum et al. (2010)
	<i>Rhizopus oryzae</i> IFO 4697	biomass support particle (BSP)	óleo de soja/ metanol	livre	90%/72 h	Sun et al. (2010)
	<i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM	bagaço de cana e solução nutriente	óleo de milho/ etanol	livre	68%/72 h	Zago et al. (2014)
	<i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM	bagaço de cana e farelo de semente de girassol	óleo de milho/ etanol	<i>n</i> -heptano	91%/48 h	Zago et al. (2014)

## 2.5 BIORREATORES PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR CATÁLISE ENZIMÁTICA

O reator de batelada tipo tanque agitado (STR - *Stirred Tank Reactor*) e o reator de leito fixo (PBR - *Packed Bed Reactor*) são os biorreatores mais estudados para produção de biodiesel por via enzimática (CHRISTOPHER, KUMAR, ZAMBAREET, 2014).

No STR, a enzima (livre ou imobilizada ou o sólido fermentado) é dispersa na mistura de reação, por agitação, enquanto que no PBR, a enzima imobilizada ou o sólido fermentado é empacotado em uma coluna. O STR é o tipo mais simples, e é adequado para misturas de alta viscosidade, sendo ideal para enzimas imobilizadas ou sólidos fermentados que são menos sensíveis à tensão de cisalhamento. A separação do biocatalisador ocorre por filtração, para a enzima imobilizada e por centrifugação, separação de fases ou pela força da gravidade, quando a enzima é livre (REN et al., 2013; REN et al., 2011).

O STR pode ser operado em batelada ou em modo contínuo, e, neste caso, o biocatalisador é mantido no reator por um filtro colocado à saída deste. No entanto, a utilização deste processo em maior escala não é indicada devido à baixa produtividade, necessidade frequente de esgotamento, limpeza e abastecimento a cada ciclo reacional (CHRISTOPHER, KUMAR, ZAMBAREET, 2014; BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996).

O PBR pode funcionar em descontínuo ou modo contínuo através da recirculação dos substratos. Estes reatores de leito fixo são os mais indicados para uso com biocatalisadores em meio heterogêneo em escala piloto e industrial, devido à sua maior eficiência, possibilidade de reutilização da enzima sem a necessidade de separação do meio reacional, minimização dos danos do biocatalisador devido à menor tensão de cisalhamento, maior área superficial por unidade de volume reacional, possibilidade de remoção de substâncias que causam inibição. Devido a estas vantagens, a utilização de PBR pode diminuir os custos operacionais do processo. No entanto, algumas desvantagens deste sistema são relatadas, como a possibilidade de compactação do leito, a formação de caminhos preferenciais e limitações de transferência de massa e calor (CHRISTOPHER, KUMAR, ZAMBAREET, 2014; LAUDANI et al., 2007;

WATANABE et al., 2001). Nestes reatores, o fluxo ascendente do substrato é geralmente o mais utilizado para que não haja compactação do leito.

Os estudos de reações PBR, em escala laboratorial, são importantes principalmente para prever o comportamento da enzima em diferentes condições, e verificar se o suporte é adequado para uso em grande escala. De acordo com a literatura, vários autores têm utilizado reatores de leito fixo com lipases imobilizadas ou sólidos fermentados em escala laboratorial, para a produção de biodiesel por transesterificação ou esterificação (SOARES et al., 2013; YOSHIDA et al., 2012; HAMA et al., 2011; CHEN et al., 2011; WANG et al., 2011; RODRIGUES et al., 2010; SALUM et al., 2010; ZAGO, 2010).

Estudos recentes foram realizados em reatores em série, estes mostram que é possível aumentar o tempo de contato entre a enzima e o meio reacional, possibilitando uma produção contínua de ésteres (HAMA et al., 2011; WANG et al., 2011). Hama et al. (2011) utilizaram cinco colunas em aço inox em série, preenchidas com a lipase Novozyme<sup>®</sup> 435 para a etanólise de óleo de soja ou canola. Na última coluna, foram obtidos 96% de conversão durante 550 h de operação. Em outro estudo, Wang et al. (2011) utilizaram três colunas de vidro em série, preenchidas com lipases de *Pseudomonas cepacia* imobilizadas em nanopartículas magnéticas (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) para a metanólise de óleo de soja em sistema com água e *n*-hexano. Na última coluna, foram obtidos 88% de conversão durante 192 h de operação.

## 2.6 PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE BODIESEL POR CATÁLISE ENZIMÁTICA

O biodiesel via catálise enzimática já é produzido em escala industrial em alguns países. Em 2012, a empresa Piedmont Biofuels (Pittsboro, North Carolina, EUA) desenvolveu uma nova tecnologia (FAeSTER - *Fatty Acid eSTERification*) para um processo de produção contínua de biodiesel utilizando a enzima imobilizada ou líquida. Este processo, segundo a empresa, permite utilizar matéria-prima com ácidos graxos livres de até 100% e as enzimas são reutilizáveis durante meses antes da substituição; além disso, o equipamento é pequeno e suficientemente simples para ser usado em instalações pré-existent



com pouca ou nenhuma modificação adicional (PIEDMONT BIOFUELS, 2014; CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBAREET, 2014). Outra empresa, a Blue Sun Biodiesel (St. Joseph, Missouri, EUA), desenvolveu o processo de produção de biodiesel por transesterificação enzimática. Segundo a empresa, neste processo é possível usar praticamente qualquer matéria-prima, sem limite para os ácidos graxos livres. A lipase usada é da empresa Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca). Não há informações sobre as condições adotadas no processo. Esta é a primeira aplicação mundial de transesterificação enzimática em escala comercial com capacidade de produção de 30 milhões de litros de biodiesel. A perspectiva da empresa é chegar a mais de 100 milhões de litros de biodiesel no final de 2015 (LANE, 2014).

Existem outros relatos sobre processos de produção de biodiesel em escala industrial pela rota enzimática. Em 2005, a indústria Hunan Rivers Bioengineering (Hunan, China), implantou o processo de produção de biodiesel por transesterificação com a lipase comercial Novozyme<sup>®</sup> 435 (imobilizada em resina acrílica), utilizando como material de partida o óleo residual de cozinha e o metanol, com capacidade de produção de 20.000 toneladas por ano (TAN; SHANG; ZHANG, 2010; TAN et al., 2010). Em 2007, em Xangai, também na China, a indústria Shanghai Lvming Environmental Protection Technology estabeleceu uma linha de produção enzimática de biodiesel por metanólise do óleo residual de cozinha com elevada acidez ( $160 \text{ mg KOH g}^{-1}$ ) catalisada pela lipase de *Candida* sp. 99-125 imobilizada em membranas têxteis, com capacidade de produção de 10.000 toneladas por ano (TAN; SHANG; ZHANG, 2010; TAN et al., 2010). Neste processo, a quantidade de enzima usada representa 0,4% para a massa de óleo e a reação é realizada em um reator do tipo tanque agitado (STR) com rendimentos de 90% em ésteres. O custo da lipase foi estimado em 200 CNY (Yuan Chinês) por tonelada de biodiesel, o que corresponde à cerca de US\$ 33 por tonelada de biodiesel, valor convertido segundo cotação de 13/11/2014 (1 USD = 6.1248 CNY). Outra indústria que usa a catálise enzimática na China é a Hainabaichuan, de Hunan. A fábrica implantou o processo com a lipase Novozyme<sup>®</sup> 435 (TAN et al., 2010).

Entretanto, há que ressaltar que o processo catalisado por lipases ainda não é competitivo com transesterificação alcalina, devido aos custos do biocatalisador, que são de 1000 USD por kg, aproximadamente, para a lipase

Novozyme<sup>®</sup> 435 (FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009). O processo enzimático ainda não foi adotado mundialmente na indústria de biodiesel também devido à baixa estabilidade da enzima no meio reacional e à baixa produtividade, devido ao longo tempo de reação requerido. Como resultado destas dificuldades, muitos estudos sobre a aplicação de lipases na produção de biodiesel ainda estão sendo desenvolvidos apenas em escala laboratorial.

Os resultados apresentados nesta seção motivaram o presente trabalho. Resultados anteriores aos deste trabalho sugerem que o desempenho do sólido fermentado de *R. microsporus* em sistema livre de solventes pode ser melhorado. Sabe-se que a aplicação da catálise enzimática em processos de síntese de biodiesel é viável, mas que existem dificuldades na implantação destes processos, principalmente relacionadas aos baixos rendimentos e ao custo do biocatalisador. Devido a isto, acredita-se que o processo de utilização de sólidos fermentados com atividade lipolítica pode contribuir para a diminuição dos custos do processo.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi o estudo do processo de esterificação em sistema livre de solventes por catálise enzimática para a síntese de ésteres etílicos, utilizando o sólido fermentado contendo lipases produzido por *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Otimizar o processo de produção das lipases de *R. microsporus*, visando aumentar a atividade enzimática do sólido fermentado utilizando resíduos agro-industriais como substratos.
- 2) Caracterizar o sólido fermentado de *R. microsporus*, frente a diferentes temperaturas, solventes e substratos.
- 3) Otimizar a síntese de ésteres etílicos em sistema livre de solventes catalisada pelo sólido fermentado de *R. microsporus* por delineamento fatorial através da variação da temperatura e razão molar entre os substratos, utilizando como material de partida o ácido oleico e a mistura de ácidos graxos da borra de soja (AGBS).
- 4) Estudar a capacidade de reutilização do sólido fermentado de *R. microsporus* em reações de esterificação em biorreator de leito fixo.
- 5) Comparar os processos de síntese de ésteres etílicos, em sistema livre de solventes, em frascos agitados e em biorreator de leito fixo empacotado com o sólido fermentado de *R. microsporus*, com recirculação dos substratos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ESTRATÉGIA

A parte experimental do presente trabalho foi realizada no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB) do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e no Laboratório de Biotecnologia do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Auto-Sustentável (NPDEAS) da UFPR. As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR. O fluxograma da estratégia do trabalho está mostrado na FIGURA 8.

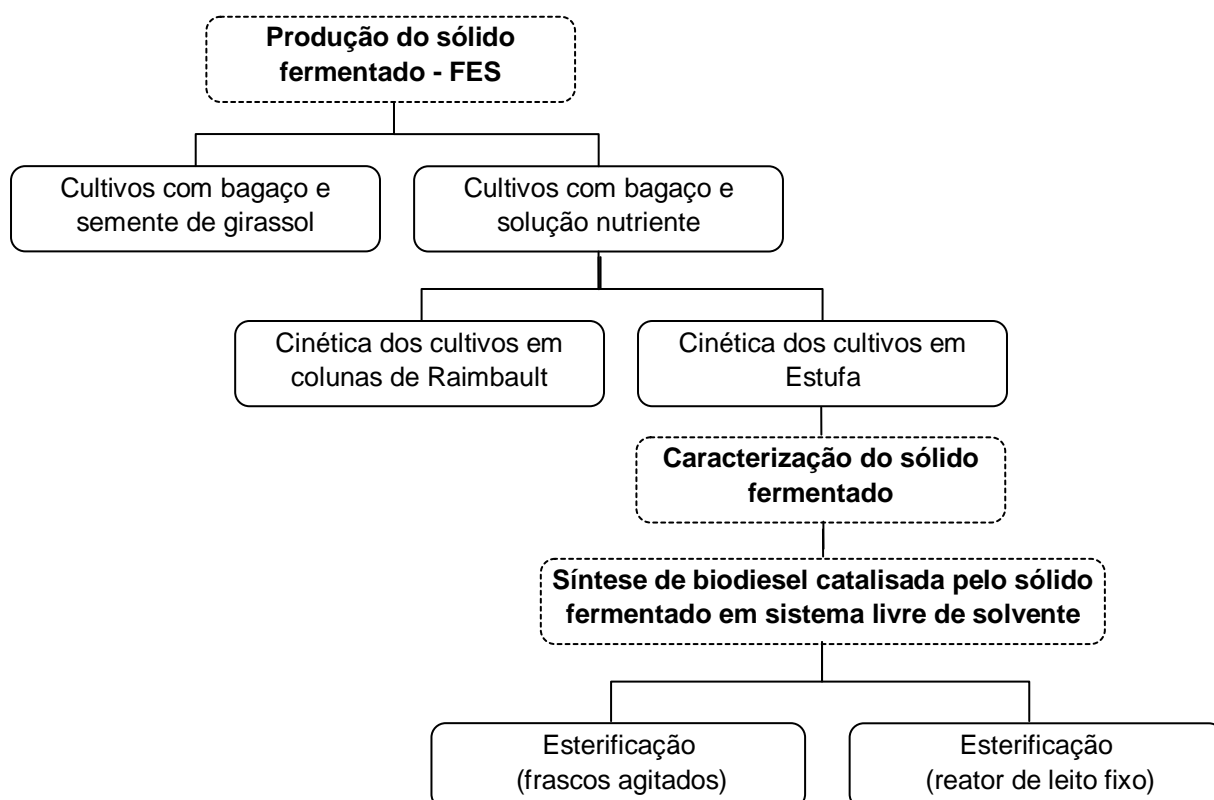


FIGURA 8 - FLUXOGRAMA DA ESTRATÉGIA DO TRABALHO

## 4.2 MATERIAIS E REAGENTES

Metanol (99,8%), etanol (99,5%), 1-propanol (99,5%), 1-butanol (99,4%), 1-pentanol (98%), 1-hexanol (98%), *n*-heptano (99,5%), *n*-hexano (99,5%) e Tween<sup>®</sup> 80 foram adquiridos da Vetec (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil). Trioleína (65%), tricaprilina (90%), ácido oleico (90%), peneira molecular (3 Å, 8-12 mesh) e heptadecanoato de metila (99,8%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA).

Os ácidos graxos do óleo da borra de soja (AGBS) foram obtidos a partir da hidrólise do óleo ácido da borra de soja em água subcrítica (SOARES et al., 2013), e gentilmente doados pela empresa Ubaldino Rodrigues Soares e Cia. Ltda. (USDA, Ponta Grossa, Paraná, Brasil). As características da mistura AGBS estão mostradas na TABELA 3.

O bagaço de cana foi gentilmente doado pela Companhia Melhoramentos Norte do Paraná (Jussara, Paraná, Brasil). O farelo de cevada e a radícula de malte foram gentilmente doados pela Cooperativa Agrária Agroindustrial (Guarapuava, Paraná, Brasil). A semente de girassol e o óleo de soja Liza da Cargill (Mairinque, São Paulo, Brasil) foram adquiridos no mercado local. Todos os outros reagentes eram de grau analítico e atenderam às especificações de pureza recomendadas pelos métodos utilizados.

TABELA 3 – CARACTERÍSTICAS DA MISTURA DE ÁCIDOS GRAXOS DA BORRA DE SOJA (AGBS)

Ácidos graxos		Composição
Palmitico	C16:0	16,5%
Esteárico	C18:0	4,2%
Oleico	C18:1	33,4%
Linoleico	C18:2	44,2%
Outros		1,7%
Massa molar média (g mol <sup>-1</sup> )		277,3
Índice de acidez (mg KOH g <sup>-1</sup> )		195,5
Índice de saponificação (mg KOH g <sup>-1</sup> )		199,0

FONTE: Soares et al. (2013)

### 4.3 PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

#### 4.3.1 Micro-organismo e preparação do inóculo

O fungo *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM foi isolado e foi cedido pelo Professor Jesús Córdova (Universidade de Guadalajara, México). Esta cepa foi caracterizada e identificada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA, UNICAMP) (ALBERTON et al., 2010). Para manutenção, o micro-organismo foi inicialmente inoculado em tubos inclinados contendo o meio Batata, Dextrose, Ágar (BDA) e incubado a 30 °C durante 7 dias. Os tubos com o fungo foram então recobertos com óleo mineral estéril e mantidos à temperatura ambiente.

Para o preparo do inóculo, removeu-se, com alça de Henle (alça de platina), um pedaço de aproximadamente 2 mm do micélio de *R. microsporus* dos tubos inclinados preparados como descrito acima, que foi, em seguida, inoculado em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio BDA e incubado por 7 dias em estufa, a 30 °C. Após esse período de incubação, os esporos foram coletados com alça de platina por raspagem e suspensos em uma solução estéril de Tween 80 a 0,01% (m/v). A concentração de esporos na suspensão foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. Esta suspensão de esporos foi imediatamente utilizada como inóculo dos cultivos em estado sólido.

#### 4.3.2 Composição dos substratos sólidos

Os substratos utilizados nos cultivos em estado sólido foram o bagaço de cana, o farelo de cevada, a radícula de malte e a farinha de semente de girassol.

A composição centesimal dos substratos bagaço de cana e farinha de semente de girassol (TABELA 4) foi determinada pelo Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA, UFPR). A umidade, o resíduo mineral fixo e os lipídeos foram determinados segundo os métodos do Instituto Adolfo Lutz

(2005). Os teores de proteínas e fibras foram determinados segundo os métodos da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (2005). O teor de carboidratos foi determinado de acordo com a Resolução RDC nº 360 (BRASIL, 2003).

**TABELA 4 – COMPOSIÇÃO DOS SUBSTRATOS UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

<b>Composição (%)</b>	<b>Bagaço de cana</b>	<b>Farinha de semente de girassol</b>
<b>Proteínas</b>	0,9	18,0
<b>Fibras</b>	88,2	28,5
<b>Carboidratos</b>	0,1	45,7
<b>Lipídeos</b>	0,5	25,9
<b>Umidade</b>	9,0	ND
<b>Resíduo mineral fixo</b>	2,0	ND

ND: não determinado

Métodos utilizados: Proteínas e fibras - AOAC (2005); Carboidratos - RDC nº 360 (BRASIL, 2003); Lipídeos, Umidade , Resíduo mineral fixo - Instituto Adolfo Lutz (2005).

#### 4.3.3 Cinética de produção de atividade do sólido fermentado

Inicialmente, foi realizada uma cinética dos cultivos descritos nos itens 4.3.4 e 4.3.5, para selecionar o melhor tempo de incubação. Foram avaliadas as atividades de hidrólise e de esterificação do sólido fermentado seco. Os cultivos foram mantidos por 42 h, com amostras coletadas a cada 6 h.

Para todas as etapas deste trabalho, as atividades de hidrólise e de esterificação do sólido fermentado foram avaliadas usando a tricaprilina (4.7.2) e o ácido oleico (4.7.3) como substratos-padrão, respectivamente.

#### 4.3.4 Cultivos em estado sólido com a mistura de bagaço de cana e farinha de semente de girassol

Inicialmente, as condições de Zago (2010) foram utilizadas como padrão para os cultivos de produção de lipases por *R. microsporus*. Neste caso, os substratos sólidos utilizados nas fermentações foram compostos de uma mistura de farinha de semente de girassol e bagaço de cana (previamente lavado), na proporção 1:1 (m/m, em base seca) com partículas entre 0,8 e 2,0 mm. Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL com 10 g da mistura dos substratos. Os substratos foram umedecidos com tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0 para ajustar o teor de umidade para 80%. Após o preparo, os frascos com substratos foram esterilizados em autoclave a 120 °C durante 15 min e resfriados em temperatura ambiente. Após o resfriamento, o substrato sólido foi inoculado com o volume requerido da suspensão de esporos, preparada como descrito no item 4.3.1, para dar cerca de  $3,7 \times 10^7$  esporos g<sup>-1</sup>SS (grama de substrato seco). Antes de cada experimento, as umidades dos substratos isolados e misturados foram determinadas em balança de infravermelho, conforme descrito em 4.7.1. Os frascos inoculados foram incubados em estufa a 40 °C.

#### 4.3.5 Cultivos em estado sólido com bagaço de cana e solução nutriente

Esta etapa teve como finalidade produzir um sólido fermentado com maior atividade lipolítica. Os cultivos em estado sólido foram realizados com o meio descrito por Rodriguez et al. (2006). Na maioria dos casos, os cultivos foram feitos em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 4 g de substrato sólido (base seca), que foram impregnados com 20 mL de uma solução nutriente, cuja composição está em 4.3.5.1. O teor de umidade inicial do sólido foi ajustado para 80%, que foi determinada em balança de infravermelho Bel modelo Top Ray (Monza, Italia) conforme descrito em 4.7.1. Os frascos inoculados foram incubados em estufa a 40 °C.



Tendo sido determinado que o melhor meio de cultivo era o bagaço de cana enriquecido com solução nutritiva, este meio foi selecionado para dar prosseguimento aos estudos (FIGURA 9).

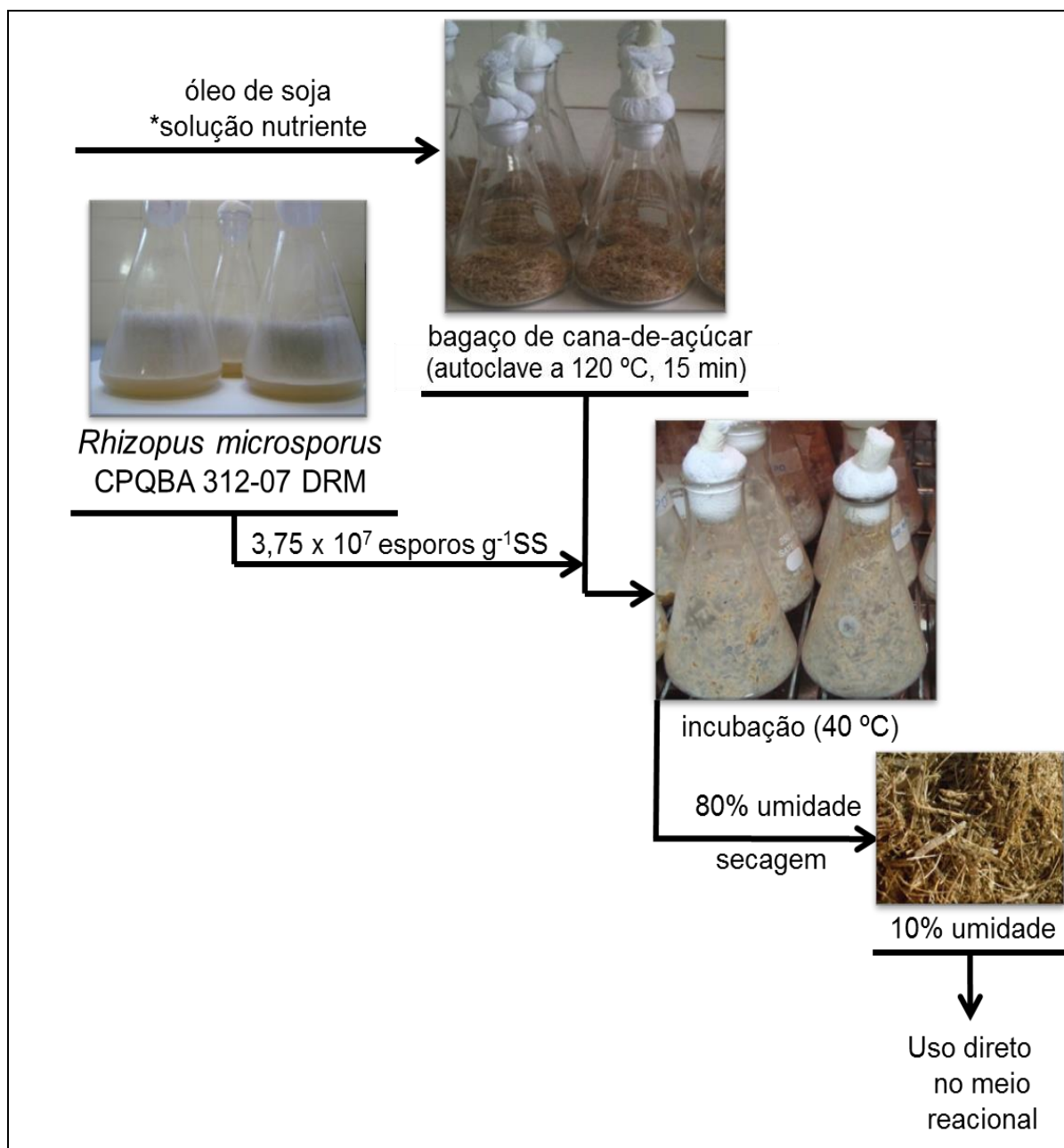


FIGURA 9 – ETAPAS DOS CULTIVOS EM ESTADO SÓLIDO COM *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL com 4 g de bagaço de cana.

#### 4.3.5.1 Preparo da solução nutriente

A solução foi preparada segundo Rodriguez et al. (2006) e continha a seguinte composição: uréia ( $4 \text{ g L}^{-1}$ ), lactose ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) e solução de oligoelementos ( $4 \text{ mL L}^{-1}$ ). O valor de pH da solução mineral foi ajustado para 7,0 com HCl a 10% (v/v). O óleo de soja, nas proporções determinadas no experimento, foi adicionado a esta solução que, em seguida, foi emulsionada em vórtex por 1 min. A solução de oligoelementos tinha a seguinte composição: EDTA ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $2,8 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $1,5 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $0,2 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $0,3 \text{ g L}^{-1}$ ). A fim de dissolver os componentes, o pH da solução de oligoelementos foi ajustado para 4,0 com HCl a 10% (v/v).

#### 4.3.6 Efeito da concentração do óleo de soja na produção da atividade de hidrólise e de esterificação do sólido fermentado

Foram realizados estudos com variação de 0,1 a 20% (m/m) de óleo de soja, que foi usado como fonte de carbono e indutor da produção de lipases. Avaliou-se a atividade de hidrólise (4.7.2) e de esterificação (4.7.3) do sólido fermentado seco.

#### 4.3.7 Efeito do substrato nos cultivos de fermentação em estado sólido

Nesta etapa foram realizados ensaios para determinação do melhor meio de cultivo para produção de lipases por FES. Para isto, foram comparados os seguintes meios: (1) bagaço de cana, (2) bagaço de cevada, (3) radícula de malte. Os substratos foram submetidos à lavagem prévia (lavados três vezes com água da torneira) e secos em estufa a  $80^\circ\text{C}$  até massa constante (DIAZ et al., 2006). Os sólidos secos foram avaliados pela sua atividade de hidrólise (4.7.2).

#### 4.3.8 Efeito do pré-tratamento do substrato sólido

No presente trabalho, com o objetivo de simplificar o processo de produção do sólido fermentado, foram realizados estudos para determinar o efeito do pré-tratamento do substrato sólido. Para tanto, foram utilizados nos cultivos (1) o bagaço *in natura* (sem qualquer tratamento) e (2) o bagaço submetido à lavagem prévia (lavado três vezes com água da torneira) e seco em estufa a 80 °C até massa constante (DIAZ et al., 2006). Nesta etapa, o bagaço de cana não foi peneirado. Avaliou-se a atividade de hidrólise do sólido fermentado seco (4.7.2)

#### 4.3.9 Efeito do tamanho das partículas do sólido

Em um trabalho anterior, Zago (2010) verificou que o tamanho das partículas do substrato sólido utilizado na fermentação de *R. microsporus* influenciou na atividade de hidrólise do sólido fermentado produzido. Neste trabalho, o efeito do tamanho das partículas foi avaliado novamente devido à modificação do meio de cultivo. Para este estudo, foram comparadas as atividades de hidrólise (4.7.2) do sólido fermentado preparado nas seguintes condições: (1) bagaço de cana peneirado antes dos cultivos e (2) bagaço de cana peneirado após os cultivos. As partículas utilizadas para estes ensaios foram: < 0,85 mm; 0,85 a 2,00 mm; e > 2,00 mm.

#### 4.3.10 Efeito da secagem do sólido fermentado

Em trabalhos anteriores (ZAGO, 2010), a secagem do sólido se dava por liofilização. No entanto, para a secagem de grandes quantidades de sólido fermentado, a secagem por liofilização pode acarretar em maior custo neste processo. Por este motivo, foram testados dois métodos alternativos: secagem em coluna com fluxo de ar desumidificado e secagem em estufa. Estes

procedimentos de secagem foram comparados com a liofilização, realizada por 24 h a - 45 °C e sob vácuo de 0,1 mBar num liofilizador Jouan LP3® modelo 60 (Allerød, Frederiksborg, Dinamarca).

Em todos os métodos de secagem testados foi utilizado o sólido fermentado de um mesmo lote, com 80% de umidade, que foi seco até aproximadamente 10% (m/m) de umidade. A eficiência da secagem, em todos os procedimentos, foi avaliada por medidas da umidade do sólido fermentado, com intervalos de 1 h, em balança de infravermelho Bel modelo Top Ray (Monza, Italia) (4.7.1). O efeito do método de secagem foi avaliado pela medida da atividade de hidrólise (4.7.2) do sólido fermentado seco, tendo como controle a atividade de hidrólise do sólido fermentado úmido (antes da secagem).

Para a secagem em coluna, foi montado um sistema fechado com dois tubos de cloreto de polivinila (PVC) transparentes conectados (SOARES et al., 2013). Foram utilizados tubos com 4,3 cm de diâmetro, 50 cm de altura e volume de 726 mL. O tubo inferior foi preenchido com sílica ativada para desumidificação do ar e o superior foi preenchido com 80 g de sólido fermentado úmido. Ar proveniente de um compressor foi introduzido na base da coluna inferior em sentido ascendente com fluxo de 20 L min<sup>-1</sup> em temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). O ar seco foi então diretamente introduzido na base da coluna com o sólido fermentado úmido. No topo da coluna superior, foi conectada uma mangueira para a saída do ar, que foi borbulhado em um frasco Erlenmeyer contendo solução de hipoclorito 10% (m/v). Durante a secagem, a umidade da sílica foi acompanhada visualmente pela mudança da coloração do indicador da sílica.

Para a secagem em estufa, foram distribuídos 100 g de sólido fermentado úmido em uma bandeja, que foi mantida em estufa com ventilação a 30 °C.

#### 4.3.11 Cinética da produção de atividade lipolítica em colunas de Raimbault

Nesta etapa, foi realizada uma cinética de cultivo do sólido fermentado em colunas de Raimbault (RAIMBAULT; ALAZARD, 1980) (FIGURAS 10, 11). Os cultivos foram monitorados de 12 a 24 h, com amostras coletadas a cada 2 h. Os

resultados de atividade de hidrólise (4.7.2) do sólido produzido nas colunas foram comparados com os cultivos em frascos Erlenmeyers realizados conforme descrito no item 4.3.5. Para os cultivos nas colunas, 8 gramas (base seca) de bagaço de cana, previamente lavado e peneirado (0,85 a 2,00 mm), umedecido com 40 mL de solução nutriente e 20% (m/m) de óleo foram autoclavados a 121 °C por 20 min. Depois do resfriamento, o substrato sólido foi inoculado com o volume requerido da suspensão de esporos, preparada como descrito no item 4.3.1. O sólido foi empacotado em colunas de vidro de 20 cm de altura x 4 cm de diâmetro (FIGURA 10). Os umidificadores de ar foram conectados na base das 12 colunas e estas foram imersas em banho de água a 40 °C conforme está esquematizado na FIGURA 11.

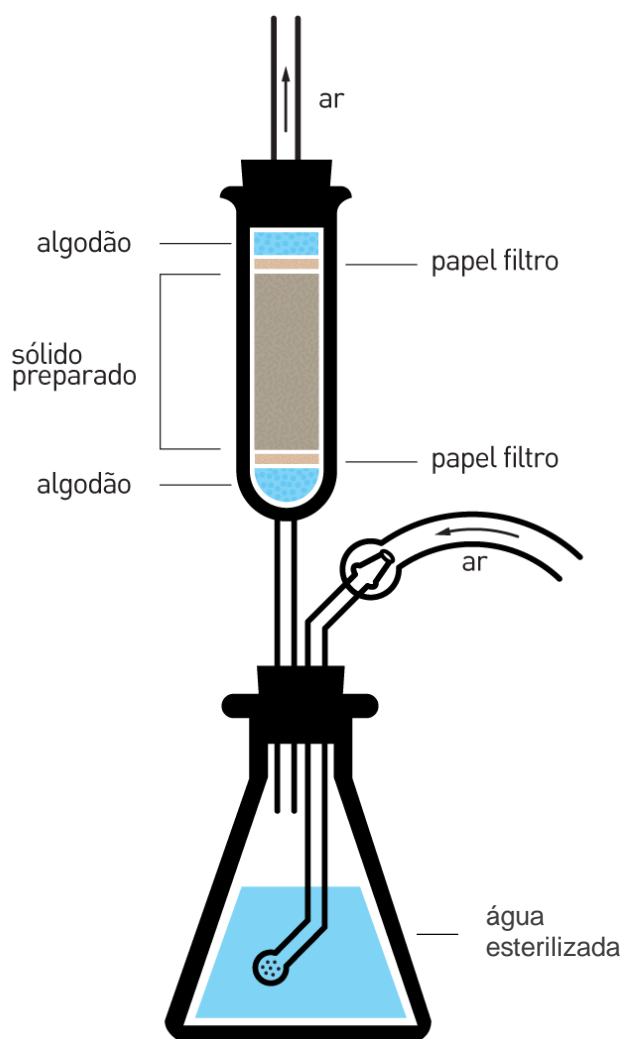


FIGURA 10 – COLUNA DE RAIMBAULT ENCAIXADA NO UMIDIFICADOR

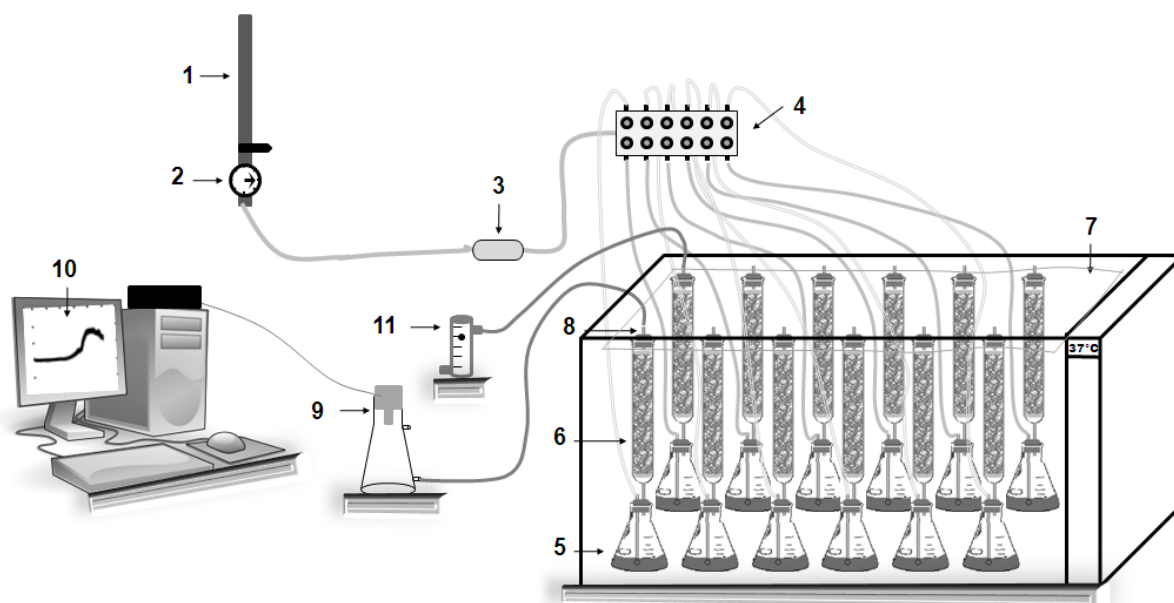


FIGURA 11 – ESQUEMA DO BIORREATOR DE COLUNAS DE RAIMBAULT

(1) ar comprimido; (2) regulador de pressão de ar; (3) filtro de ar; (4) distribuidor de ar; (5) umidificador; (6) colunas; (7) banho termostatzado; (8) saída de ar da coluna; (9) sensor de O<sub>2</sub>; (10) software para aquisição de dados; rotâmetro; (11) rotâmetro.

FONTE: Slivinski (2012)

A umidade inicial do meio foi de 80%. Cada coluna recebeu uma taxa de fluxo de ar de 200 mL min<sup>-1</sup>. Os níveis de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> foram monitorados nas saídas de ar das colunas com sensores CI-6562 e CI-6561, respectivamente, e registrados usando um software de aquisição de dados CI-6871G (ambos da Pasco®, Roseville-USA).

#### 4.3.12 Produção do sólido fermentado com diferentes massas de substrato

Após serem definidas as melhores condições para os cultivos em estado sólido, surgiu a necessidade de produzir um lote de sólido fermentado para utilizar durante todo o trabalho. Assim, a quantidade de substrato em base seca foi aumentada 8 vezes (32 g em frascos de 2000 mL), em relação à massa de 4 g (frascos de 250 mL) utilizada habitualmente (item 4.3.5). As condições utilizadas nas fermentações foram iguais em todos os frascos e as proporções entre inóculo

e substrato foram mantidas constantes, cerca de  $3,7 \times 10^7$  esporos  $\text{g}^{-1}\text{SS}$ . Para verificar a eficácia dos cultivos foram avaliadas as atividades de hidrólise do sólido fermentado (4.7.2).

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO

##### 4.4.1 Estabilidade da atividade lipolítica do sólido fermentado ao armazenamento

O sólido liofilizado foi acondicionado em sacos plásticos e armazenado a 4 °C e a -18 °C, e sua estabilidade foi avaliada durante 12 meses, retirando-se alíquotas do material e determinando-se a sua atividade de hidrólise (4.7.2) que foi expressa em percentual da atividade de hidrólise do sólido fermentado seco.

##### 4.4.2 Efeito da temperatura na atividade do sólido fermentado

Nesta etapa, foram avaliadas a atividade de hidrólise e de esterificação do sólido fermentado, assim como a estabilidade do sólido fermentado frente a diferentes temperaturas.

A atividade de hidrólise do sólido fermentado foi determinada contra o substrato padrão, a tricaprilina, e também contra a trioleína (4.7.2), em temperaturas de 20 a 60 °C. A atividade de esterificação do sólido fermentado foi determinada usando ácido oleico e etanol em *n*-heptano (4.7.3), em temperaturas de 20 a 65 °C.

Para determinar a estabilidade da atividade das lipases frente à temperatura, o sólido fermentado foi incubado em *n*-heptano em temperaturas de 20 a 65 °C. Nestes ensaios, 500 mg do sólido foram adicionados a 5 mL de *n*-heptano em frascos de vidro de 50 mL hermeticamente fechados com tampas de teflon, e incubados por 24 h em agitador orbital, a 200 rpm. Após a incubação, retirou-se o sólido do meio por filtração em papel de filtro qualitativo (Whatman),

secou-se em dessecador por 16 h a 4 °C e determinou-se sua atividade de esterificação (4.7.3). Os resultados foram expressos em termos de atividade de esterificação residual (%) em relação a 100%, obtidos para a atividade de esterificação do sólido fermentado não submetido à incubação (controle).

#### 4.4.3 Estabilidade da atividade do sólido fermentado em solventes orgânicos

O estudo da estabilidade da atividade do sólido fermentado foi realizado por medida da atividade de esterificação antes e após a incubação em solventes orgânicos. Para isto, incubaram-se 500 mg do sólido fermentado seco em 5 mL de solventes orgânicos por 24 h a 30 °C, em um agitador orbital a 200 rpm, em frascos de vidro de 50 mL hermeticamente fechados com tampas de teflon. Após a incubação, retirou-se o sólido do meio por filtração em papel de filtro qualitativo (Whatman). Em seguida, as amostras foram secas em dessecador por 16 h a 4 °C e determinou-se a sua atividade de esterificação (4.7.3). Os resultados foram expressos em termos de atividade de esterificação residual (%) em relação a 100%, obtidos para a atividade de esterificação do sólido fermentado não submetido à incubação (controle). Os solventes utilizados neste estudo e seus respectivos log P foram: *n*-heptano (4,00); *n*-hexano (3,50); *terc*-butanol (1,45); 1-butanol (0,80); 1-propanol (0,25); etanol (- 0,31) e metanol (- 0,76).

#### 4.4.4 Especificidade da atividade de esterificação frente a diferentes ácidos graxos

Foram determinadas as atividades de esterificação do sólido fermentado e as conversões em éster utilizando ácidos graxos saturados e insaturados, com comprimentos de cadeia variados: C8 (ácido octanóico - caprílico), C12 (ácido dodecanóico - láurico), C14 (ácido tetradecanóico - mirístico), C16 (ácido hexadecanóico - palmítico), C18 (ácido octodecanóico - esteárico), C18:1 (ácido *cis*-9-octadecenóico - oleico) e C18:2 (ácido *cis,cis*-9,12-octadecadienóico - linoleico). Para todas as reações foram utilizados 1 g do sólido fermentado, 10 mL



de meio reacional que continha  $70 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido graxo,  $210 \text{ mmol L}^{-1}$  de etanol e 96% de *n*-heptano. As condições reacionais e de análise dos ésteres estão descritas no item 4.7.3.

#### 4.4.5 Estudo de reutilização do sólido fermentado em reações de esterificação em *n*-heptano

Repetições da reação de síntese do oleato de etila foram realizadas utilizando o mesmo sólido fermentado, analisando-se as conversões em ester após cada ciclo, que foram expressas em relação à conversão obtida no primeiro ciclo. Foram utilizados 1 g de sólido fermentado, 10 mL de meio reacional que continha  $210 \text{ mmol L}^{-1}$  de etanol,  $70 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido oleico e 96% de *n*-heptano. As condições das reações e análises ocorreram conforme descrito no item 4.7.3. A cada ciclo, o sólido fermentado foi separado do meio reacional por filtração, lavado com *n*-heptano (3 lavagens de 25 mL) e seco em dessecador a vácuo por 16 h a  $4^\circ\text{C}$ . A cada vez que a amostra era reutilizada, ela foi pesada e os volumes do solvente e dos reagentes foram corrigidos para um valor proporcional à quantidade do sólido fermentado recuperada, visto que ocorreram perdas do material.

### 4.5 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÉSTERES EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES, EM FRASCOS AGITADOS

#### 4.5.1 Efeito do comprimento da cadeia do álcool

Para estes ensaios, o ácido oleico comercial (Sigma-Aldrich 90% de pureza) foi usado como substrato padrão. Foram utilizados seis diferentes álcoois primários: metanol, etanol, 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol e 1-hexanol. As reações foram realizadas em frascos de vidro de 50 mL hermeticamente fechados com tampas de teflon, utilizando 90 mmol de álcool e 30 mmol de ácido oleico

(RM 3:1) e 1,8 g de sólido fermentado seco, em um agitador orbital a 200 rpm a 40 °C. O etanol foi adicionado em duas etapas, no início da reação e após 24 h (ZAGO et al., 2014). Em intervalos fixos de tempo, alíquotas do meio reacional (cerca de 200 mg) foram coletadas e lavadas três vezes com 1 mL de solução saturada de NaCl, para retirada do excesso de etanol. Após lavagem, a fração orgânica, contendo os ésteres, foi transferida para um microtubo Eppendorf contendo 20 mg de sulfato de sódio anidro, que foi agitado em Vórtex® por 20 s e mantido em repouso por 30 min. Em seguida, o material foi centrifugado a 5000×g por 5 min e a amostra lavada e seca foi transferida para outro Eppendorf limpo. O teor de éster das amostras foi avaliado por cromatografia gasosa, conforme descrito em 4.7.5.

#### 4.5.2 Efeito do teor de água

Para avaliar a influência do teor de água na conversão de equilíbrio, foram feitas reações conforme em 4.5.1. Estas reações foram feitas com uma mistura reacional contendo 90 mmol de etanol e 30 mmol de ácido oleico, correspondentes à RM 3:1 (etanol: ácido graxo). A influência do teor de água foi avaliada através da adição (5, 10, 20 ou 30%) de água (m/m, baseados na massa total de substratos orgânicos) ou de peneira molecular (3 Å, 8-12 mesh), que foi adicionada à mistura reacional no início da reação e após 24 h. Antes do uso, a peneira molecular foi ativada em mufla por 3 h a 300 °C e resfriada em dessecador à temperatura ambiente. Durante a reação, alíquotas foram coletadas, tratadas e analisadas conforme descrito em 4.5.1.

#### 4.5.3 Otimização da síntese de ésteres etílicos por planejamento fatorial

Foi realizado um planejamento fatorial  $2^2$  (BRUNS; BARROS NETO; SCARMINO, 2001), tendo como objetivo a otimização da reação de esterificação em frascos agitados em ausência de solvente orgânico. As seguintes variáveis e

níveis foram avaliadas: temperatura, 40 °C (nível - 1) e 50 °C (nível + 1); RM (razão molar) dos substratos (etanol: ácidos graxos), 1:1 (nível - 1) e 5:1 (nível + 1). Estes parâmetros foram escolhidos com base em experimentos prévios (temperatura item 4.4.2; RM de acordo com ZAGO, 2010; tempo de reação 48 h, item 4.5.1). O planejamento foi realizado para dois materiais de partida: o ácido oleico comercial (Sigma-Aldrich, 90% de pureza) e a mistura de ácidos graxos da borra de soja (AGBS) produzida por hidrólise em água subcrítica (SOARES et al., 2013). A variável-resposta avaliada foi a conversão em éster. Durante a reação, as amostras foram avaliadas por cromatografia gasosa, 4.7.5.

Foram realizados experimentos para todas as combinações dos níveis selecionados com triplicata do ponto central (nível 0). Para medir a influência de cada variável na reação, foi calculada a contribuição de cada uma delas nas respostas estudadas. Para tal, fez-se o uso do esquema de sinais (+ 1, e - 1), multiplicando-os um a um para obter os resultados correspondentes aos coeficientes de contraste atribuídos aos efeitos principais e secundários. Em seguida, procedeu-se à somatória dos valores respeitando os sinais atribuídos e o resultado foi dividido por quatro, que corresponde ao número total de experimentos ( $b^2 = 4$ ), dividido por 2 (EQUAÇÃO 1).

$$EP = \frac{2 [\sum y^+ - \sum y^-]}{(b^2)} \quad (1)$$

onde:

EP = efeitos principais

$b^2$  = número total de experimentos

$y^+$  = níveis máximos dos parâmetros (50 °C; RM 5:1)

$y^-$  = níveis mínimos dos parâmetros (40 °C; RM 1:1)

O ajuste do modelo foi avaliado pelos parâmetros coeficiente de determinação ( $R^2$ ), percentual de variância explicada e percentual máximo de variância explicável. O efeito das variáveis foi avaliado pela (ANOVA). A análise

de regressão, testes estatísticos e superfícies de resposta foram determinados usando o software STATISTICA® versão 10.0 (Tulsa, Oklahoma, EUA).

O delineamento fatorial mostrou maiores conversões com aumento da razão molar e diminuição da temperatura, RM 5:1 a 40 °C. Esta região fica localizada em um ponto extremo, ficando talvez fora a faixa ótima de maior conversão. Devido a estes resultados, na sequência dos estudos de otimização da síntese de ésteres etílicos foram estudadas as razões molares de 10:1 e 15:1 e as temperaturas de 35 e 40 °C.

As reações foram realizadas de acordo com o item 4.5.1. Foram utilizados 300 mmol de etanol e 30 mmol de ácido oleico ou da mistura de AGBS (RM 10:1), e 450 mmol de etanol e 30 mmol de ácido oleico ou da mistura de AGBS (RM 15:1) e 1,8 g de sólido fermentado seco, durante a reação as amostras foram avaliadas por cromatografia gasosa, 4.7.5. O etanol foi adicionado em duas etapas, no início da reação e após 24 h (ZAGO et al., 2014).

#### 4.6 PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍlicos EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES, EM BIORREATOR DE LEITO FIXO

As reações de esterificação foram realizadas em biorreator de leito fixo com recirculação dos substratos em escala de bancada (FIGURA 12), conforme descrito por Soares et al. (2013).

O sistema é composto por um reservatório de meio reacional (4,4 cm de diâmetro interno e 9,0 cm de altura) e uma coluna de vidro encamisada (2,7 cm de diâmetro interno e 21 cm de altura), com recirculação de água para manter a temperatura do meio reacional.

A coluna foi preenchida com 10,8 g de sólido fermentado (base seca), colocado na coluna através de um funil e então levemente prensado com o auxílio de um bastão de vidro. Nas extremidades da coluna foram colocados filtros em tecido de algodão no mesmo diâmetro da coluna para evitar arraste do sólido fermentado. A coluna foi então fechada com rolhas de silicone. O reservatório foi abastecido com 50 g de AGBS (180 mmol, considerando massa molar de 277 g), e 83 g de etanol (1800 mmol), equivalentes à RM 10:1 (etanol:ácido graxo). O etanol foi adicionado em duas etapas (0 e 24 h) e a mistura reacional foi mantida

no reservatório sem agitação. Essa mistura foi continuamente recirculada em um fluxo ascendente através da coluna (5 mL min<sup>-1</sup>), utilizando uma bomba peristáltica, modelo 45MHP10 (Metex Corporation, Buffalo, Nova York, EUA). Foi avaliado o efeito da temperatura (40, 45 e 50 °C) sobre a conversão em éster. Durante a reação, alíquotas de 200 mg do meio reacional foram coletadas, lavadas e analisadas conforme descrito em 4.5.1.

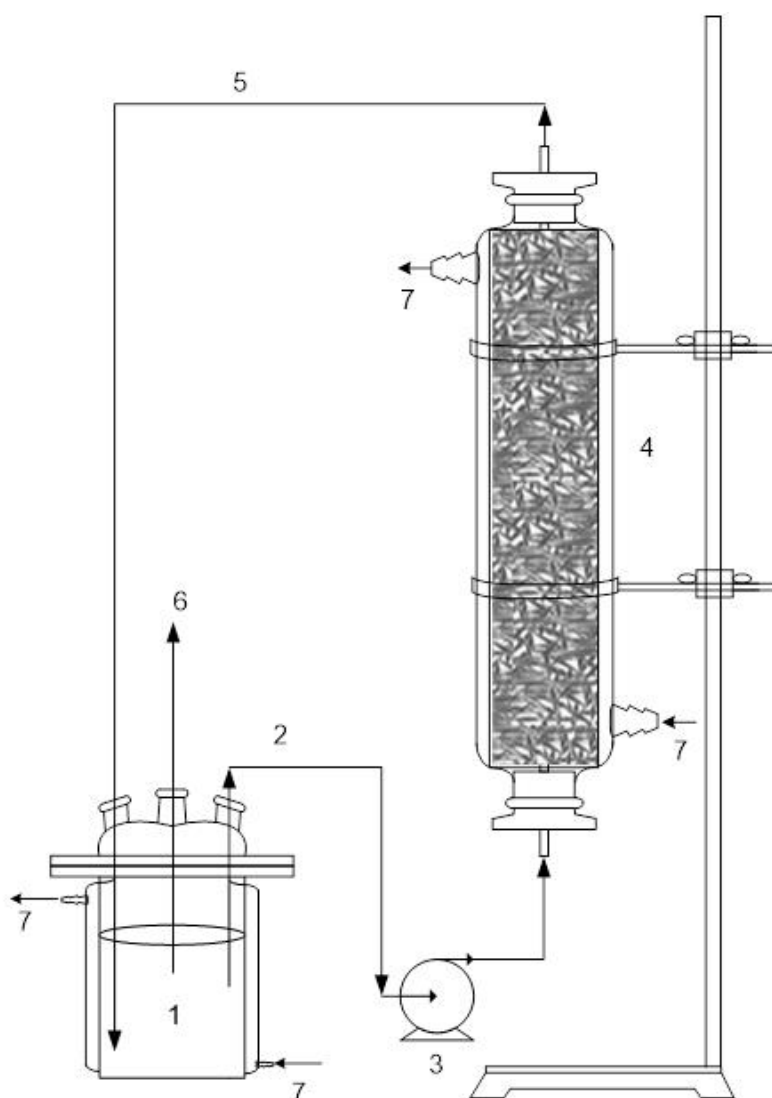


FIGURA 12 – REATOR DE LEITO FIXO PREENCHIDO COM O SÓLIDO FERMENTADO DE *Rhizopus microsporus* PARA A SÍNTESE DE BIODIESEL

(1) reservatório contendo meio reacional; (2, 5) meio reacional em recirculação; (3) bomba peristáltica; (4) coluna de vidro preenchida com sólido fermentado; (6) amostragem; (7) circulação de água termostatzada.

Fonte: Soares (2014)

#### 4.6.1 Estudo de reutilização do sólido fermentado

O estudo de reutilização do sólido fermentado em reações de esterificação em sistema livre de solventes foi realizado nas mesmas condições descritas acima, na temperatura de 40 °C e RM 10:1 (etanol:AGBS), pois estas foram as melhores condições obtidas nos frascos agitados. O sólido fermentado foi reutilizado por cinco ciclos de 48 h cada. Após cada ciclo, a mistura reacional contida no leito fixo foi bombeada em fluxo descendente para o reservatório ( $5 \text{ mL min}^{-1}$ ), com o auxílio da bomba peristáltica, por 20 min. Em seguida, a mistura reacional foi coletada e substituída por uma nova mistura. As conversões foram analisadas após cada ciclo de reutilização e expressas em percentual da conversão obtida no primeiro ciclo.

### 4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 4.7.1 Determinação da umidade dos substratos e dos sólidos fermentados

O teor de umidade das amostras foi determinado em balança de infravermelho Bel modelo Top Ray (Monza, Itália). Para este ensaio, foi utilizado 1 g de amostra. O equipamento foi operado no modo programado, com temperatura de 80 °C até obtenção de massa constante, geralmente por 30 min, tempo suficiente para a amostra secar.

#### 4.7.2 Determinação da atividade de hidrólise

A determinação da atividade lipolítica de hidrólise foi realizada utilizando o sólido fermentado seco adicionado diretamente no meio reacional, pelo método titulométrico em titulador automático do tipo pH-Stat da Metrohm, modelo 718 Stat

Titrimo (Herisau, Appenzell, Suíça). O método consiste na titulação com NaOH ( $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) dos ácidos graxos liberados pela ação da lipase sobre os triacilgliceróis. Foi preparada uma emulsão com água destilada, goma arábica 3% (m/v),  $\text{CaCl}_2$  ( $2 \text{ mmol L}^{-1}$ ), tampão Tris-HCl ( $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0) e NaCl ( $150 \text{ mmol L}^{-1}$ ) (TISS; CARRIERE; VERGER, 2001). A esta emulsão foram adicionados os substratos tricaprilina ou trioleína ( $67 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Esta mistura foi homogeneizada durante 5 min em liquidificador Arno Optimix (Arno, São Paulo, Brasil). O sólido fermentado seco (150 mg) foi adicionado em 20 mL de emulsão no próprio vaso de reação (capacidade de 50 mL e termostatizado), sob agitação magnética (300 rpm). O meio reacional foi ajustado para pH 7,0 por titulação no próprio equipamento e as reações foram seguidas por 5 min. Uma unidade de atividade lipolítica (U) foi definida como equivalente a um  $\mu\text{mol}$  de ácidos graxos por min, nas condições do ensaio. A atividade lipolítica de hidrólise foi expressa como unidades de atividade por grama de sólido fermentado seco ( $\text{U g}^{-1}\text{SS}$ ). A atividade de hidrólise ( $A_H$ ) foi calculada com a EQUAÇÃO 2.

$$A_H = \frac{dV/dt \times [\text{NaOH}] \times f \times F_{\text{pH}}}{M_{\text{SF}}} \quad (2)$$

onde:  $dV/dt$  é a velocidade inicial do consumo de NaOH em  $\text{mL min}^{-1}$ ;  $[\text{NaOH}]$  é a concentração de NaOH em  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ ;  $f$  é o fator de correção da solução de NaOH padronizada (adimensional);  $M_{\text{SF}}$  é a quantidade de sólido fermentado (base seca) em gSS e  $F_{\text{pH}}$  é o fator de correção (adimensional) relacionado à dissociação parcial dos ácidos graxos da tricaprilina e trioleína em pH 7,0, que possuem um valor de  $\text{pK}_a$  de 4,9 e 6,8, respectivamente.

#### 4.7.3 Determinação da atividade de esterificação

A atividade de esterificação do sólido fermentado seco foi avaliada utilizando como reação-padrão a síntese do oleato de etila, de acordo com

Fernandes et al. (2007). As reações foram realizadas em agitador orbital a 200 rpm, com frascos de vidro de 50 mL hermeticamente fechados com tampas de teflon contendo 5 mL de meio reacional e 500 mg de sólido fermentado seco. O meio reacional continha 210 mmol L<sup>-1</sup> de etanol e 70 mmol L<sup>-1</sup> de ácido oleico solubilizados em *n*-heptano (RM 3:1). Em intervalos fixos, alíquotas de 100 µL foram coletadas do meio reacional e analisadas quanto ao teor de ácido graxo residual, através método de Lowry-Tinsley (1976) (item 4.7.4).

Para os cálculos de atividade de esterificação, foi considerada a velocidade inicial do consumo dos ácidos graxos, que corresponde ao coeficiente angular da equação ajustada aos pontos iniciais (faixa de linearidade) de um gráfico de concentração de ácido graxo (µmol) versus tempo (min).

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como equivalente ao consumo de um µmol min<sup>-1</sup> de ácidos graxos, nas condições do ensaio. A atividade foi expressa como unidades de atividade de esterificação por grama de sólido seco (U g<sup>-1</sup>SS), calculada a partir da EQUAÇÃO 3.

$$A_E = \frac{dN_{AG}}{dt} \times \frac{1}{M_{SF}} \quad (3)$$

onde:  $dN_{AG}/dt$  é a velocidade do consumo dos ácidos graxos em µmol min<sup>-1</sup> e  $M_{SF}$  é a quantidade de sólido fermentado em g (base seca).

#### 4.7.4 Determinação de ácidos graxos livres

O método colorimétrico de Lowry e Tinsley (1976) foi utilizado para determinar a concentração de ácidos graxos residuais nas amostras durante as reações de esterificação em presença de solvente orgânico (*n*-heptano). Trata-se de um método que mede a coloração do complexo azul-esverdeado (715 nm) formado entre os íons cobre e os ácidos graxos solúveis em fase orgânica.



Para cada ensaio, foram adicionados 100 µL da amostra em microtubos Eppendorfs de 2 mL, contendo 1,15 mL de tolueno e o reativo de cor (250 µL), que consiste em uma solução aquosa de acetato de cobre II (5% m/v), com pH (6,0-6,2), corrigido previamente com piridina. A mistura foi agitada em vórtex durante 40 s e a absorbância da fase orgânica foi lida em 715 nm, em espectrofotômetro (modelo UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japão).

#### *Cálculo da conversão em éster em reações em presença de n-heptano*

As conversões em éster das reações de esterificação em presença de *n*-heptano (item 4.4.4 e 4.4.5) foram calculadas de acordo com a EQUAÇÃO 4.

$$\text{Conversão (\%)} = \frac{(C_0 - C_t) \times 100}{C_0} \quad (4)$$

onde:  $C_0$  é a concentração dos ácidos graxos no tempo zero em  $\text{mmol L}^{-1}$  e  $C_t$  é a concentração dos ácidos graxos no tempo de reação, expressa em  $\text{mmol L}^{-1}$ .

#### 4.7.5 Cromatografia em fase gasosa

O teor de ésteres de ácidos graxos determinado por cromatografia em fase gasosa (CG) pela Norma Européia 14103 (EN, 2003) nas amostras obtidas a partir das reações de esterificação em sistema livre de solventes (item 4.5 e 4.6). Para tanto, 50 mg da amostra seca foram adicionados a 1 mL de solução de heptadecanoato de metila (C17) ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$  em *n*-heptano), utilizado como padrão interno. As análises foram feitas em equipamento modelo GC-2010 (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com detector de ionização de chama (FID-flame ionization detector), com coluna capilar Rtx-wax (Restek, Bellefonte,

Pensilvânia, EUA), com 30 m de comprimento x 0,32 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura de filme líquido de polietilenoglicol. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio, com taxa de fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 250 °C. A rampa de aquecimento da coluna foi iniciada a 120 °C por 2 min e, na sequência, a coluna foi aquecida à razão de 10 °C min<sup>-1</sup> até 180 °C, e mantida nessa temperatura por 3 min; em seguida, foi aquecida à razão de 5 °C min<sup>-1</sup> até 230 °C, permanecendo nessa temperatura por 2 min. O volume de injeção da amostra foi de 1 µL, com razão de *splitting* 1:50. Os dados foram coletados por meio do software GC Real Time<sup>®</sup>. O teor de éster foi calculado somando-se as áreas de todos os picos (menos o pico do solvente) e relacionando-as com a área do pico do padrão interno C17, de acordo com a EQUAÇÃO 5. Os resultados foram expressos em percentual (%) de éster.

$$C = \frac{(\Sigma_A) - A_{EI}}{A_{EI}} \times \frac{C_{EI} \times V_{EI}}{m} \times 100\% \quad (5)$$

onde:

$\Sigma_A$  = soma das áreas dos picos

$A_{EI}$  = área do heptadecanoato de metila (C17)

$C_{EI}$  = concentração em mg mL<sup>-1</sup> de heptadecanoato de metila

$V_{EI}$  = volume em mL de heptadecanoato de metila

$m$  = massa em mg da amostra

As reações também foram comparadas em termos de produtividade. As produtividades em éster ( $P_E$ ) foram calculadas com a EQUAÇÃO 6.

$$P_{\text{ÉSTER}} = \frac{X \times N_{AG} \times MM_E}{M_{SF} \times t} \quad (6)$$

onde:  $P_E$  é a produtividade em éster expressa em mg de éster produzido por grama de sólido (base seca) por hora de reação ( $\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$ );  $X$  é a conversão em percentual (por exemplo: para 90% de conversão, foi substituído na fórmula o valor de 0,9);  $M_{SF}$  é a massa de sólido fermentado (base seca) (gSS) utilizada na reação;  $t$  é o tempo (h) de reação no ponto avaliado;  $N_{AG}$  é o número de mols inicial de ácidos graxos em mmol, e  $MM_E$  é a massa molar dos ésteres produzidos. Para o oleato de etila foi utilizado o valor de  $310 \text{ g mol}^{-1}$  e para os etílicos da mistura de ácidos graxos da borra de soja foi utilizado o valor de  $305 \text{ g mol}^{-1}$ , que foi calculado a partir da massa molar média dos ácidos graxos que compõem a amostra.

#### 4.7.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises em microscopia eletrônica de varredura foram realizadas em um microscópio modelo Phenom, marca Fei (Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR) com a finalidade de verificar alterações no substrato sólido antes e após a FES. A técnica de microscopia eletrônica de varredura permite visualizar a superfície do material. As análises foram realizadas com aproximadamente 0,5 mg do substrato sólido (massa seca). Como procedimento padrão do laboratório, e, para obtenção das imagens de superfície foi depositado um filme de ouro sobre o substrato sólido.

#### 4.8 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DAS AMOSTRAS

Para comparar se duas amostras apresentavam diferenças estatísticas entre si, foi aplicado o teste  $t$ , com o auxílio das ferramentas de análise do Excell, com nível de significância de 5%. Assim, para um valor de  $p > 0,05$  significa que não houve diferença estatisticamente significativa entre a média das amostras e para  $p < 0,05$  significa que houve diferença estatisticamente significativa entre a média das amostras comparadas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

#### 5.1.1 Cinética de produção de atividade do sólido fermentado

Em trabalhos anteriores, Zago et al. (2014) e Alberton et al. (2010) otimizaram e produziram sólidos fermentados com *R. microsporus* usando como substratos uma mistura de 1:1 de farelo de semente de girassol com bagaço de cana (SFBG). No entanto, neste trabalho, as condições de cultivo foram alteradas a fim de aumentar a atividade lipolítica do sólido. Para isto, testou-se um novo meio de cultivo para a FES, substituindo-se o farelo de semente de girassol por bagaço de cana impregnado por uma solução nutriente composta por uréia, óleo de soja e minerais e oligoelementos (SFBU) (RODRIGUEZ et al., 2006).

A fim de verificar se o tempo de fermentação de 18 h, habitualmente utilizado, estava adequado para o novo meio de cultivo, estudou-se a cinética da produção do sólido fermentado com atividade lipolítica contra tricaprilina e de esterificação contra o ácido oleico e etanol, conforme metodologias descritas em 4.7.2 e 4.7.3, respectivamente (FIGURA 13).

Os sólidos fermentados produzidos pelos dois meios de cultivos apresentaram maiores atividades de hidrólise e de esterificação em até 24 h de fermentação (FIGURA 13A e 13B). O valor máximo da atividade de hidrólise de SFBU foi em 18 h, 210 U g<sup>-1</sup>SS (FIGURA 13A). SFBG apresentou a máxima atividade de hidrólise em 24 h, 163 U g<sup>-1</sup>SS. A máxima atividade de esterificação (15 U g<sup>-1</sup>SS em 18 h) (FIGURA 13B) foi obtida para SFBU. No mesmo tempo de cultivo, SFBG apresentou atividade de 8,6 U g<sup>-1</sup>SS. O decréscimo da atividade observado na FIGURA 13, para hidrólise e esterificação, pode ser devido à produção de proteases no meio de cultura conforme já foi relatado por Rasera et al. (2012). O melhor tempo de cultivo para produção de lipases de 18 h está de acordo com os dados de Zago et al. (2014) e Alberton et al. (2010), que utilizaram a mistura de bagaço de cana com farelo de semente de girassol. Os resultados

desta etapa mostram que SFBU proporcionou um aumento de cerca de 60% na atividade de hidrólise e de esterificação do sólido fermentado.

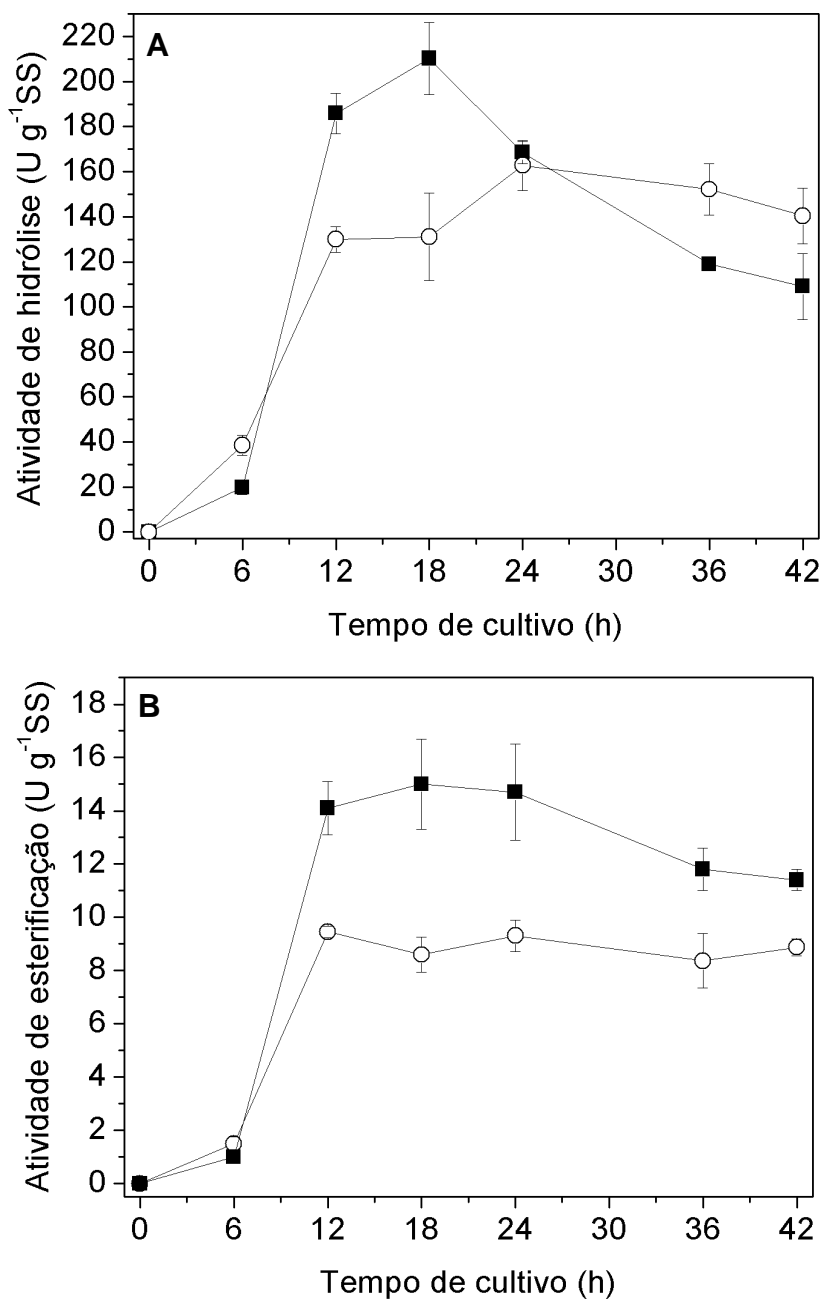


FIGURA 13 – CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE LIPASES DURANTE OS CULTIVOS EM ESTADO SÓLIDO DE *Rhizopus microsporus*

(A) Atividade de hidrólise; (B) Atividade de esterificação. Substrato: (■) bagaço e uréia com solução salina; (○) bagaço:farinha de semente de girassol. Determinação da atividade de hidrólise: tricaprilina, 0,15 g de sólido fermentado a 37 °C. Determinação da atividade de esterificação: 5 mL de meio com 96% de *n*-heptano, razão molar 3:1 (etanol: ácido oleico) e 0,5 g de sólido fermentado a 200 rpm a 40 °C. Os valores apresentados são a média das análises em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média.

### 5.1.2 Efeito da concentração do óleo de soja na produção da atividade de hidrólise e de esterificação do sólido fermentado

Após a escolha do novo meio de cultivo, SFBU, foram realizados novos ensaios de produção do sólido fermentado com o objetivo de reduzir a percentagem do óleo de soja usado como fonte de carbono e indutor da produção de lipases durante os cultivos (20%), pois este dificultava a secagem do sólido e poderia interferir nos ensaios de síntese de ésteres.

Estudaram-se percentagens entre 1 e 15% de óleo adicionados ao meio de cultivo, comparadas ao controle (20% de óleo) (FIGURA 14). As atividades de hidrólise e de esterificação aumentaram em função do aumento da concentração de óleo, sendo a máxima atividade obtida foi do experimento controle.

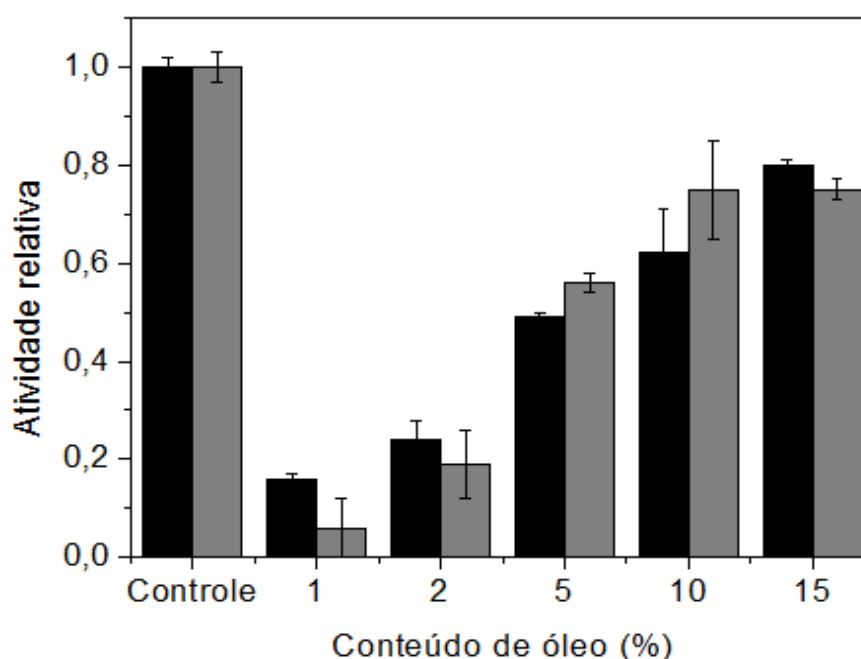


FIGURA 14 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO DE SOJA NA PRODUÇÃO DE LIPASES EM CULTIVOS NO ESTADO SÓLIDO DE *Rhizopus microsporus*

(■) atividade relativa de hidrólise, (▒) atividade relativa de esterificação. Condições de cultivo: bagaço de cana, uréia (0,4%) e solução salina por 18 h a 40 °C. Controle: 20% de óleo. Determinação da atividade de hidrólise: tricaprilina, 0,15 g de sólido fermentado a 37 °C. Determinação da atividade de esterificação: 5 mL de meio com 96% de *n*-heptano, razão molar 3:1 (etanol: ácido oleico) e 0,5 g de sólido fermentado, 200 rpm a 40 °C. Atividade relativa: percentagem das atividades de hidrólise e de esterificação obtidas em relação ao controle (20% de óleo). Os valores apresentados são a média das análises em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média.

### 5.1.3 Efeito do substrato nos cultivos de fermentação em estado sólido

A produção de lipases depende em grande parte das técnicas de cultivo dos micro-organismos, da composição do meio e das condições de cultivo (SALIHU et al., 2012; MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006; MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2002). No caso da FES, resíduos agrícolas podem ser utilizados como substratos a fim de minimizar os custos do processo e também para diminuir o dano ambiental causado pelo descarte indevido destes resíduos.

Nesta etapa, para os cultivos em estado sólido, testaram-se três diferentes substratos, impregnados pela solução nutriente composta por uréia, óleo de soja e oligoelementos (RODRIGUEZ et al., 2006) (TABELA 5). As maiores atividades de hidrólise foram obtidas com os sólidos fermentados produzidos com o bagaço de cana ( $233 \text{ U g}^{-1}\text{SS}$ ) e com a radícula de malte ( $204 \text{ U g}^{-1}\text{SS}$ ). Assim, optou-se por dar continuidade com o bagaço de cana, que já vinha sendo utilizado em trabalhos anteriores.

TABELA 5 – EFEITO DO SUBSTRATO NOS CULTIVOS DE *Rhizopus microsporus*

Substrato	Atividade de hidrólise ( $\text{U g}^{-1}\text{SS}$ )
Bagaço de cana	$233 \pm 14$
Radícula de malte	$204 \pm 45$
Farelo de cevada	$55 \pm 6$

Condições de cultivo: 4 g de substrato (base seca), umidade inicial 80% a 40 °C e 18 h de incubação. Atividade de hidrólise: método titulométrico (pHStat) com tricaprilina a 37 °C e pH 7,0. Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média.

### 5.1.4 Efeito do pré-tratamento do substrato sólido

Nesta etapa do trabalho, testaram-se o efeito da lavagem do bagaço *in natura*, assim como a esterilização prévia do material na autoclave na atividade do sólido fermentado (TABELA 6).

TABELA 6 – ATIVIDADE LIPOLÍTICA DO SÓLIDO FERMENTADO DE *Rhizopus microsporus* OBTIDO DE DIFERENTES PREPARAÇÕES DO BAGAÇO DE CANA

	Preparação	Atividade de hidrólise (U g <sup>-1</sup> SS)
<b>Não autoclavado</b>	bagaço <i>in natura</i>	146 ± 14
	bagaço <i>in natura</i> pré-lavado	156 ± 35
<b>Autoclavado</b>	bagaço <i>in natura</i>	153 ± 23
	bagaço <i>in natura</i> pré-lavado	170 ± 30

Condições de cultivo: 4 g de bagaço de cana (base seca), umidade inicial 80% a 40 °C e 18 h de incubação. Atividade de hidrólise: método titulométrico (pHStat), substrato tricaprilina a 37 °C.

Em todas as fermentações desta etapa, utilizou-se o bagaço de cana sem tamisação. As maiores atividades de hidrólise foram obtidas com o sólido fermentado produzido com o bagaço de cana *in natura* pré-lavado e autoclavado (170 U g<sup>-1</sup>SS) e com bagaço de cana *in natura* pré-lavado não autoclavado (156 U g<sup>-1</sup>SS). Optou-se por lavar e autoclavar o bagaço antes de realizar os cultivos.

#### 5.1.5 Efeito do tamanho das partículas do sólido

De acordo com Soares et al. (2013), Zago (2010) e Salum et al. (2010), o tamanho das partículas influencia na atividade do sólido fermentado. Por isto, devido à heterogeneidade do tamanho das partículas do bagaço de cana utilizado nos cultivos de FES, realizou-se um estudo a fim de garantir a reprodutibilidade dos resultados obtidos (TABELA 7). Foram comparadas as atividades do sólido fermentado peneirado, antes e após os cultivos, com diferentes tamanhos de partículas. As maiores atividades de hidrólise foram obtidas com as partículas menores do sólido fermentado (< 0,85) (TABELA 7). No entanto, mesmo que as partículas menores tenham apresentado valores superiores de atividade, optou-se por peneirar o bagaço antes da fermentação e utilizar partículas entre 0,85 a 2,00 mm, visto que partículas pequenas podem causar compactação do leito quando empacotadas em um biorreator, o que tornaria inviável o futuro escalonamento do processo de produção de biodiesel.



TABELA 7 – ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DO SÓLIDO FERMENTADO DE *Rhizopus microsporus* OBTIDO DE DIFERENTES GRANULOMETRIAS DO SÓLIDO

Tamisação	Abertura (mm)	Peneira (mesh)	Atividade de hidrólise (U g <sup>-1</sup> SS)
<b>Antes dos cultivos</b>	< 0,85	20	251 ± 4
	0,85 a 2,00	20 a 10	233 ± 13
	> 2,00	12 a 8	186 ± 8
<b>Após os cultivos</b>	< 0,85	20	266 ± 7
	0,85 a 2,00	20 a 10	157 ± 9
	> 2,00	12 a 8	68 ± 2

Condições de cultivo: 4 g de bagaço de cana (base seca), umidade inicial 80% a 40 °C e 18 h de incubação. Atividade de hidrólise: método titulométrico (pHStat), substrato tricaprilina a 37 °C.

A qualidade do bagaço de cana varia de acordo com fatores como a sazonalidade. É possível contornar este problema utilizando um mesmo lote de bagaço para um trabalho científico. Porém, em um processo industrial, vários lotes de substrato estarão disponíveis. Por isso, foi avaliada a influência do lote do bagaço de cana na atividade de hidrólise do sólido fermentado. Não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre as atividades do sólido fermentado produzido com o bagaço de cana de dois lotes diferentes, lote recebido em 2010 e lote recebido em 2011 (dados não mostrados).

#### 5.1.6 Efeito da secagem do sólido fermentado

Em trabalhos anteriores, o sólido fermentado havia sido liofilizado, antes do uso nas reações de síntese. Porém, a produção de sólido fermentado em grande escala requer um processo de secagem mais econômico e menos dispendioso do que o de liofilização. Por isto, neste trabalho avaliaram-se métodos de secagem mais simples, como a secagem em estufa com ventilação a 30 °C e a secagem em coluna com fluxo de ar seco em temperatura ambiente (25 °C), conforme descrito por (SOARES et al., 2013) para o sólido fermentado de *Burkholderia*

*cepacia* LTEB 11. Os resultados foram comparados por medidas de atividade de hidrólise contra tricaprilina do sólido fermentado úmido (80% de umidade) e do sólido fermentado seco (10% de umidade) (TABELA 8). Os resultados mostraram que o melhor processo de secagem do sólido é a liofilização, mas que, mesmo assim, houve uma diminuição de 32% da atividade em relação ao sólido úmido.

A estabilidade de sólidos fermentados a processos de secagem é provavelmente dependente do tipo de micro-organismo utilizado na FES. Em outros estudos, Alberton et al. (2010) também constataram perda da atividade de cerca de 32% do sólido fermentado de *R. microsporus* após secagem por liofilização. Já Martinez-Ruiz et al. (2008), para *Rhizopus* sp., não verificaram diferença significativa entre os processos de liofilização e secagem por fluxo de ar seco, tendo relatado um decréscimo de cerca de 18% para ambos os casos. Por outro lado, Soares et al. (2013), para o sólido fermentado por *B. cepacia* LTEB11, mostraram que o processo de secagem, seja por liofilização ou por secagem em coluna de ar seco, não acarretou em perda de atividade do sólido.

Em vista destes resultados, o processo de liofilização continuou a ser utilizado na sequencia deste trabalho.

TABELA 8 – EFEITO DA SECAGEM NA ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DO SÓLIDO FERMENTADO DE *Rhizopus microsporus*

Tratamento	Atividade de hidrólise (U g <sup>-1</sup> SS)	Atividade residual (%)
Sólido fermentado úmido	342 ± 56	100
Secagem em coluna	181 ± 24	53
Secagem em estufa	133 ± 13	39
Secagem em liofilizador	233 ± 14	68

Condições de secagem: coluna – 100 g de sólido úmido, fluxo de ar ascendente 20 L min<sup>-1</sup>, 5 h em temperatura ambiente; estufa – 100 g de sólido úmido, 24 h a 30 °C; liofilização – 4 g de sólido fermentado (base seca) em cada balão de fundo redondo, 24 h a – 45 °C e 0,1 mbar. Atividade de hidrólise: método titulométrico (pHStat) contra tricaprilina a 37 °C e pH 7,0. Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata ± o erro padrão da média.

### 5.1.7 Cinética da produção de atividade lipolítica em colunas de Rimbault

A fim de verificar se a aeração forçada favorece a produção de lipases, estudou-se a cinética de produção do sólido fermentado em colunas de Rimbault (RAIMBAULT; ALAZARD, 1980). Com aeração forçada de  $200 \text{ mL min}^{-1}$ , obteve-se atividade máxima de hidrólise ( $195 \text{ U g}^{-1}\text{SS}$ ) em 16 h de cultivo (FIGURA 15). Nas mesmas condições, com o mesmo material de partida, em frascos Erlenmeyers acondicionados em estufa, a atividade em 16 h foi de  $295 \text{ U g}^{-1}\text{SS}$ . Foi observado que em frascos não houve diferença significativa na atividade em 16 h e 18 h ( $p > 0,05$ ). Desta forma, optou-se por continuar produzindo o sólido fermentado utilizando os frascos Erlenmeyers em estufa com 18 h de cultivo.

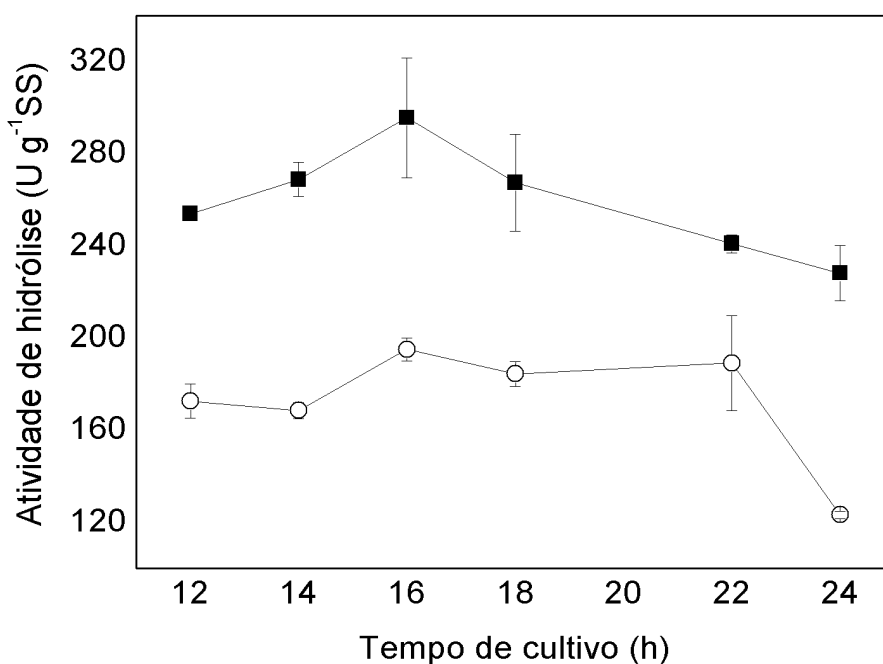


FIGURA 15 – CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE LIPASES DURANTE OS CULTIVOS EM ESTADO SÓLIDO DE *Rhizopus microsporus* EM COLUNAS DE RAIMBAULT E EM ESTUFA

Tipos de cultivo: (■) frascos Erlenmeyers em estufa; (○) em colunas de Rimbault. Determinação da atividade de hidrólise: tricaprilina, 0,15 g de sólido fermentado a  $37^{\circ}\text{C}$ . Os cultivos foram conduzidos a  $40^{\circ}\text{C}$ ; nas colunas de Rimbault com um fluxo de ar ascendente de  $200 \text{ mL min}^{-1}$ . Os valores apresentados representam as médias das análises em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média.

### 5.1.8 Produção do sólido fermentado com diferentes massas de substrato

Até esta etapa do trabalho, os cultivos eram feitos em frascos Erlenmeyers de 250 mL com 4 g de bagaço de cana (base seca). Porém, para realizar todos os experimentos deste trabalho era necessária uma maior quantidade de sólido fermentado. Por isso, foram feitas fermentações em frascos Erlenmeyers maiores, aumentando proporcionalmente a quantidade de substrato sólido e inóculo (TABELA 9). O aumento não favoreceu a produção de lipases, pois a atividade de hidrólise do sólido fermentado produzido com 32 g de substrato em frascos de 2000 mL foi 40% menor do que a obtida do sólido fermentado produzido com 4 g de substrato.

TABELA 9 – ATIVIDADES DE HIDRÓLISE DO SÓLIDO FERMENTADO DE *Rhizopus microsporus* COM CULTIVOS PRODUZIDOS COM DIFERENTES MASSAS DE SUBSTRATO

<b>Dimensões do frasco Erlenmeyer (mL)</b>	<b>Quantidade de sólido fermentado (base seca, g SS)</b>	<b>Atividade de hidrólise (U g<sup>-1</sup> SS)</b>
250	4	220 ± 9
2000	32	133 ± 2

Condições de cultivo: bagaço de cana (base seca), umidade inicial 80% a 40 °C e 18 h de incubação. Atividade de hidrólise: método titulométrico pHStat, substrato tricaprilina a 37 °C.

A FES é uma estratégia que tem sido amplamente utilizada para produzir lipases extracelulares de fungos e bactérias em estudos recentes (TABELA 10).

Vários são os fatores que dificultam a comparação dos resultados: (1) o método e o substrato utilizado na determinação da atividade lipolítica; (2) os diferentes tipos de substratos e condições de cultivo utilizadas na FES para a produção de lipases; e (3), o fato que nem todos os trabalhos relatam os componentes do meio de cultura, como a quantidade de óleo usada nos cultivos (TABELA 10).

TABELA 10 – UMA SELEÇÃO DE ESTUDOS SOBRE CULTIVOS EM ESTADO SÓLIDO POR FUNGOS E BACTÉRIAS PARA PRODUÇÃO DE LIPASES (CONTINUA)

	Condições de cultivo			Determinação da atividade		
	Micro-organismo produtor da lipase	Preparado Enzimático/ Suporte	Temperatura/ Tempo	Substrato/ Temperatura	Atividade/ (U g <sup>-1</sup> SS)	Referência
Hidrólise	<i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM	bagaço de cana, solução nutriente e óleo de soja	40 °C/18 h	tricaprilina/ 37 °C	183 ± 11	Este trabalho
	<i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM	bagaço de cana, solução nutriente e óleo de soja	40 °C/18 h	tricaprilina/ 50 °C	264 ± 1	Este trabalho
	<i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM	bagaço de cana e farelo de semente de girassol	40 °C/18 h	tricaprilina/ 37 °C	91	Zago et al. (2014)
	<i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM	bagaço de cana e farelo de semente de girassol	40 °C/18 h	tricaprilina/ 50 °C	51 ± 1	Alberton et al. (2010)
	<i>Rhizopus</i> sp.	perlita, solução nutriente e óleo de oliva	45 °C/24 h	óleo de oliva/ 45 °C	62	Martinez-Ruiz et al. (2008)
	<i>Rhizopus microsporus</i>	perlita, solução nutriente e óleo de oliva	45 °C/20 h	pNPP/óleo de oliva/ 45 °C	7,1 ± 0,9/ 16,6 ± 0,3	Hernández-Rodriguez et al. (2009)
	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>chinensis</i>	perlita, solução nutriente e óleo de oliva	45 °C/20 h	pNPP/óleo de oliva/ 45 °C	11,1 ± 0,6/ 72,4 ± 5,7	Hernández-Rodriguez et al. (2009)
	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>tuberosus</i>	perlita, solução nutriente e óleo de oliva	45 °C/20 h	pNPP/ óleo de oliva/ 45 °C	15,2 ± 1,6/ 74,0 ± 7,0	Hernández-Rodriguez et al. (2009)

TABELA 10 – UMA SELEÇÃO DE ESTUDOS SOBRE CULTIVOS EM ESTADO SÓLIDO POR FUNGOS E BACTÉRIAS PARA PRODUÇÃO DE LIPASES (CONCLUSÃO)

Condições de cultivo			Determinação da atividade			
	Micro-organismo produtor da lipase	Preparado Enzimático/ Suporte	Temperatura/ Tempo	Substrato/ Temperatura	Atividade/ (U g <sup>-1</sup> SS)	Referência
Hidrólise	<i>Rhizopus chinensis</i> <i>CCTCC M201021R</i>	farelo de trigo, farinha de trigo e óleo de oliva	30 °C/71 h	<i>p</i> NPP/40 °C	138	Sun, Xu e Wang (2009)
	<i>Rhizopus oryzae</i>	farelo de trigo e óleo de coco	35 °C/120 h	<i>p</i> NPP/36 °C	97	Garlapati e Banerjee (2010)
	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	bagaço de cana, farelo de semente de girassol e óleo de oliva	37 °C/96 h	óleo de oliva/ 40 °C	73	Liu et al. (2014)
	<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	farelo de milho e óleo de milho	29 °C/72 h	<i>p</i> NPP/37 °C	108	Fernandes et al. (2007)
	<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	bagaço de cana e farelo de semente de girassol	29 °C/96 h	<i>p</i> NPP/37 °C	234	Salum et al. (2010)
	<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	bagaço de cana e farelo de semente de girassol	29 °C/96 h	trioleína/40 °C	92	Soares et al. (2013)
Esterificação	<i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM	bagaço de cana, solução nutriente e óleo de soja	40 °C/18 h	ácido oleico /40 °C	15	Este trabalho
	<i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM	bagaço de cana e farelo de semente de girassol	40 °C/18 h	ácido oleico/ 44 °C	6	Zago (2010)
	<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	bagaço de cana e farelo de semente de girassol	29 °C/72 h	ácido oleico/ 40 °C	5	Soares et al. (2013)

pNPP = palmitato de *p*-nitrofenila

Observa-se (TABELA 10) que o tempo de cultivo para a produção de sólido fermentado com cepas de *Rhizopus* varia de 18 a 72 h, com temperaturas variando entre 30 a 45 °C. Para cepas de *Burkholderia*, o tempo de cultivo variou de 72 e 96 h com temperaturas de 28 a 37 °C. Neste trabalho, a quantidade de óleo de soja que propiciou a maior atividade foi de 20% usada nos cultivos variou de 1 a 20%. Alguns autores, como Liu et al. (2014), usaram, além de cerca de 10% de óleo de oliva, o farelo de semente de girassol, que possui em sua composição aproximadamente 25% de lipídeos (SALUM, 2010).

Dentre os estudos mostrados na TABELA 10, a FES do presente trabalho foi realizada em menor tempo de cultivo comparando com os cultivos de *Rhizopus* e também de *Burkholderia*. Além disto, as atividades de hidrólise e de esterificação do sólido fermentado de *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM foram superiores às dos outros sólidos fermentados. Ressalta-se que, com o uso do novo meio de cultivo, onde se utiliza o bagaço de cana, é possível reduzir os custos da produção de lipases.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO

Realizaram-se diversos cultivos com o meio novo, bagaço de cana impregnado pela solução nutriente e óleo de soja, para a produção do sólido fermentado, SFBU, que foi liofilizado e utilizado para todas as etapas do trabalho. SFBU seco apresentou atividade de hidrólise e de esterificação. Porém, SFBU úmido apresentou somente atividade de hidrólise.

### 5.2.1 Análise do sólido por Microscopia Eletrônica de Varredura

Na FIGURA 16 estão mostradas as fotomicrografias do bagaço de cana antes e após os cultivos.

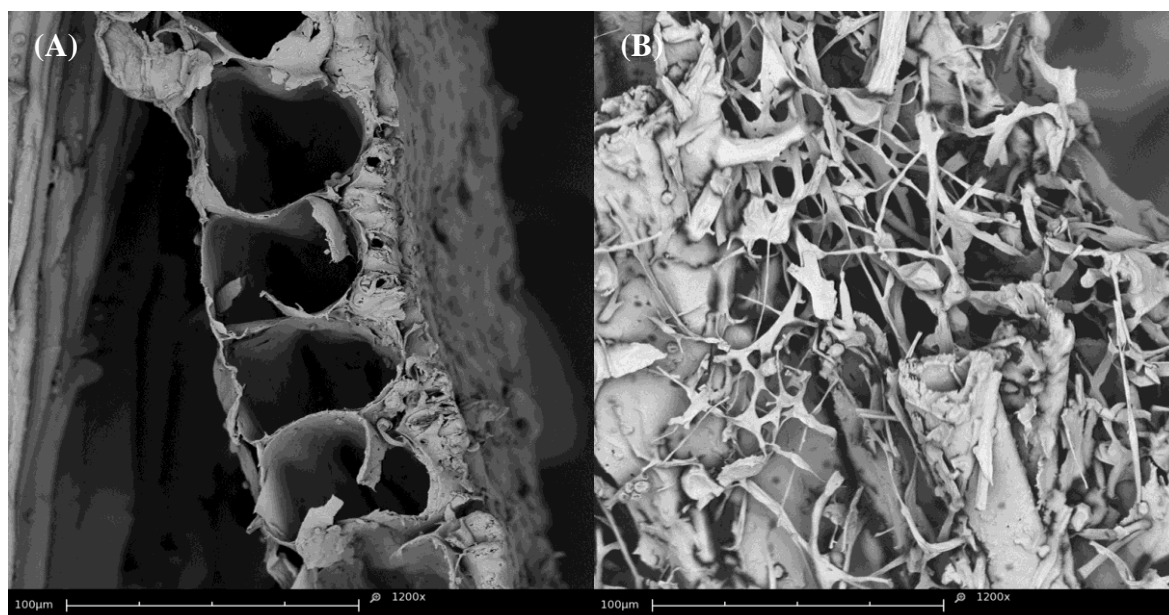


FIGURA 16 - FOTOMICROGRAFIA DO BAGAÇO DE CANA (A) ANTES E (B) APÓS OS CULTIVOS DE *Rhizopus microsporus* (SFBU)

Aumento: 1200 vezes.

Observa-se uma superfície bastante heterogênea com muitas cavidades vazias no bagaço de cana antes da fermentação (FIGURA 16A). Na FIGURA 16B está mostrado o bagaço de cana após a FES (SFBU), observam-se as cavidades parcialmente recobertas, com células de *R. microsporus*.

#### 5.2.2 Estabilidade da atividade lipolítica do sólido fermentado ao armazenamento

Investigou-se a estabilidade da atividade enzimática do sólido fermentado frente ao armazenamento a 4 °C e a - 18 °C (FIGURA 17). Para tanto, amostras de sólido fermentado liofilizado, armazenadas em recipientes plásticos vedados, foram periodicamente coletadas para determinação da atividade de hidrólise. A atividade de hidrólise (183 U g<sup>-1</sup>SS) do sólido fermentado armazenado a - 18 °C foi mantida por 12 meses, mas quando o sólido foi armazenado a 4 °C, houve perda de 23% da atividade nos primeiros 3 meses, e, após 12 meses, a atividade residual foi de apenas 37%. O sólido armazenado a 4 °C apresentou aumento na



umidade de 200%, o que pode ter ocasionado a sua perda de atividade. A partir destes resultados, optou-se por armazenar o sólido fermentado a - 18 °C, que foi acondicionado em sacos plásticos, para evitar contato com ar e umidade. Os resultados de estabilidade do sólido fermentado seco armazenado a - 18 °C obtidos neste trabalho são excelentes.

Zago (2010) relatou perda de atividade de 15%, quando o sólido fermentado seco produzido com o mesmo fungo, *R. microsporus*, foi armazenado a 4 °C. Para o sólido fermentado com *B. cepacia* LTEB11, Soares et al. (2013) relataram perda de 10% de atividade do sólido seco em coluna armazenado em temperatura ambiente após 8 meses e não houve perda de atividade em 12 meses quando o sólido foi armazenado a 4 °C.

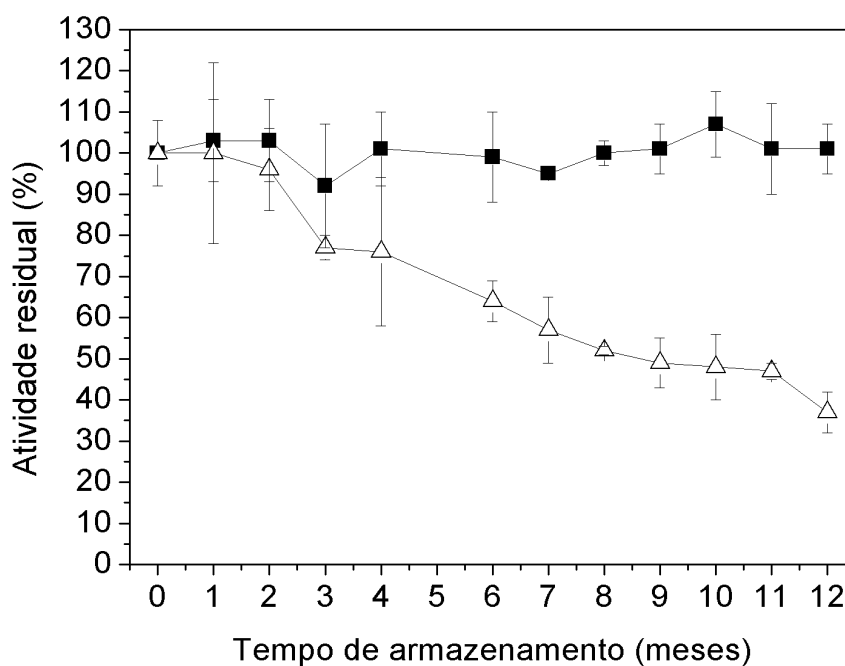


FIGURA 17 – ESTABILIDADE AO ARMAZENAMENTO DO SÓLIDO FERMENTADO DE *Rhizopus microsporus*

(■) - 18 °C; (Δ) 4 °C. Determinação da atividade de hidrólise: substrato tricaprilina, 0,15 g de sólido fermentado a 37 °C. Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média.

### 5.2.3 Efeito da temperatura na atividade do sólido fermentado

O intervalo de temperatura ótima para atividade de hidrólise e de esterificação das lipases de *R. microsporus* contidas no sólido fermentado situa-se entre 45 e 55 °C, com atividade de hidrólise máxima contra a tricaprilina e trioleína a 50 °C (264 U g<sup>-1</sup>SS e 170 U g<sup>-1</sup>SS, respectivamente) (FIGURA 18A) e atividade de esterificação máxima de 19 U g<sup>-1</sup>SS (FIGURA 18B).

A maior atividade de hidrólise encontrada para a tricaprilina em todas as temperaturas (55% maior, a 50 °C) (FIGURA 18A) pode estar relacionada a dois fatores: (1) à especificidade das lipases, que seria maior para a tricaprilina, ou (2) à qualidade da emulsão formada pela tricaprilina, que, por ser de cadeia curta, estaria mais dissolvida no meio, proporcionando maior área interfacial e, em decorrência disso, maior atividade enzimática.

A faixa de temperatura para a atividade ótima das lipases de *R. microsporus* contidas no sólido fermentado (45 a 55 °C) está de acordo com resultados da literatura para lipases do gênero *Rhizopus* (ZAGO, 2010; ALBERTON et al., 2010; MARTÍNEZ-RUIZ et al., 2008; DIAZ et al., 2006; RODRIGUEZ et al., 2006).

Nesta etapa, avaliou-se também a estabilidade das lipases do sólido fermentado incubando-o por 24 h em *n*-heptano, em diferentes temperaturas (FIGURA 19). Observou-se que a enzima manteve cerca de 100% da sua atividade inicial quando incubada entre 20 e 45 °C, diminuindo nas temperaturas de 50 a 65 °C.

Comparado aos resultados relatados na literatura para lipases do gênero *Rhizopus*, as lipases de *R. microsporus* contidas no sólido fermentado apresentaram maior estabilidade à temperatura, principalmente levando em conta o longo tempo de incubação, que foi de 24 h.

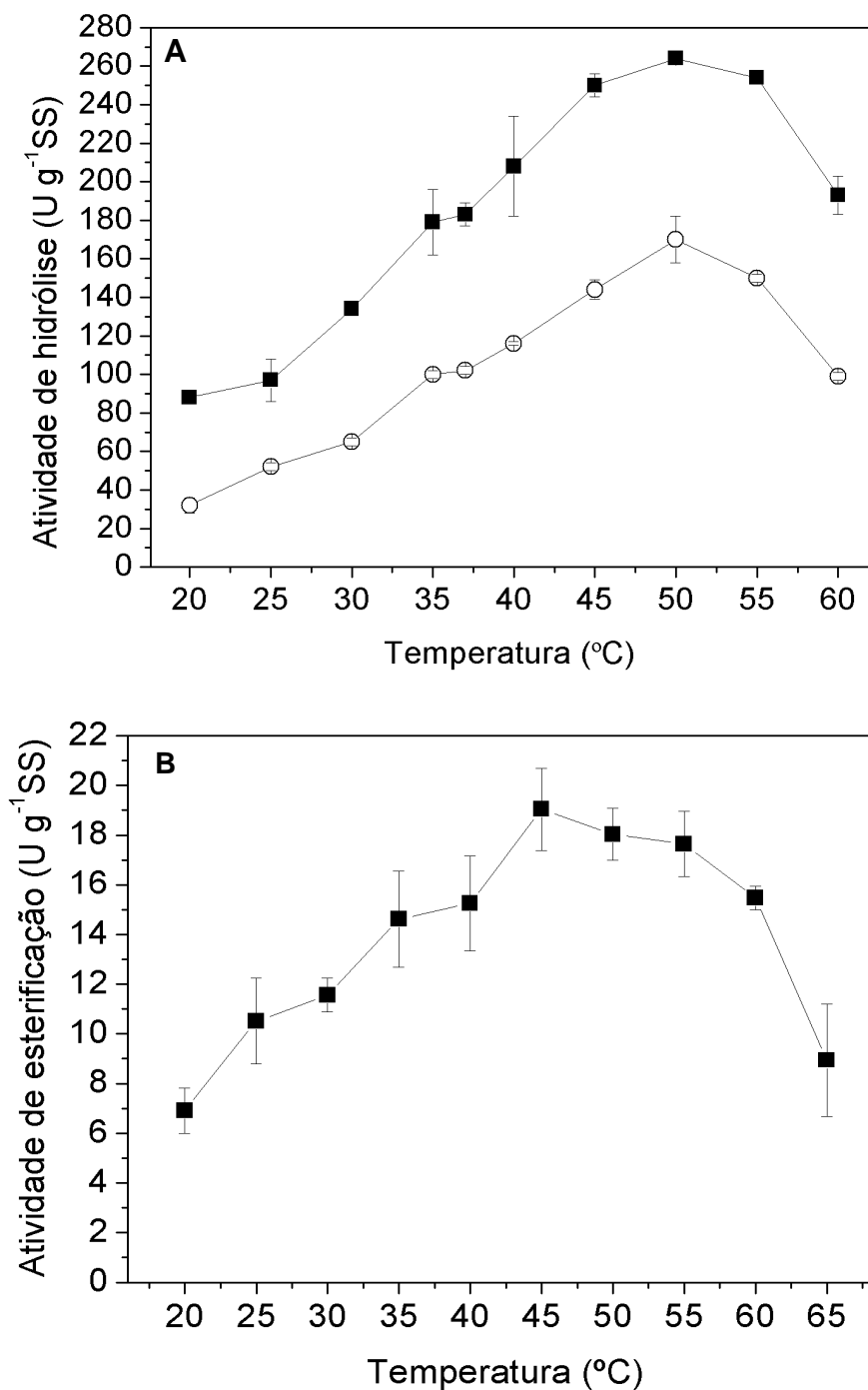


FIGURA 18 – EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DE HIDRÓLISE E DE ESTERIFICAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO DE *Rhizopus microsporus*

(A) Atividade de hidrólise: (■) tricapriline; (○) trioleína; (B) Atividade de esterificação. Determinação da atividade de hidrólise: tricapriline ou trioleína, 0,15 g de sólido fermentado. Determinação da atividade de esterificação: 5 mL de meio com 96% de *n*-heptano, razão molar 3:1 (etanol: ácido oleico) e 0,5 g de sólido fermentado a 200 rpm. Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média.

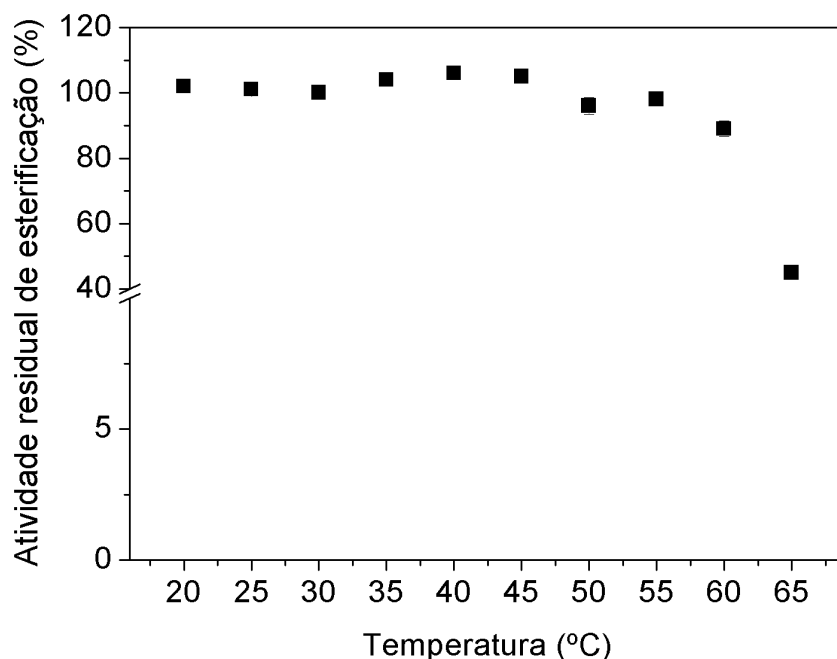


FIGURA 19 – ESTABILIDADE DA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO DE *Rhizopus microsporus* À TEMPERATURA

Condições de incubação: 5 mL de *n*-heptano, 0,5 g de sólido fermentado, a 200 rpm por 24 h. Determinação da atividade de esterificação: 5 mL de meio com 96% de *n*-heptano, razão molar 3:1 (etanol: ácido oleico) e 0,5 g de sólido fermentado, 200 rpm a 40 °C. Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média.

Outros autores como Hernández-Rodriguez et al. (2009) também determinaram o efeito da temperatura e do tipo de solvente orgânico na estabilidade das lipases de sólido fermentado com *R. microsporus* var. *tuberosus* e *R. microsporus* var. *chinensis*. O sólido fermentado seco foi incubado durante 1 h em tolueno, *i*-propanol e acetonitrila, a 30, 40 e 50 °C. As lipases de *R. microsporus* var. *tuberosus* tiveram sua atividade de esterificação reduzida em 50% apenas após a incubação em *i*-propanol a 40 °C. A atividade de esterificação das lipases de *R. microsporus* var. *chinensis* aumentou após incubação em tolueno a 30 e 40 °C; entretanto, as lipases perderam toda atividade após 1 h de incubação em isopropanol e acetonitrila a 30 °C e a 50 °C. Em outro estudo, Madalozzo et al. (2014) estudaram a estabilidade térmica da lipase recombinante de *R. oryzae* expressa em *Pichia pastoris* imobilizada em Accurel® MP-1000 frente à incubação em tampão Tris-HCl pH 8,0, em temperaturas entre 20 e 50 °C por 24 h. A lipase manteve mais de 60% de atividade residual de hidrólise contra trioleína entre 30 e 40 °C, mas, a partir de 40 °C, houve perda total da atividade.

#### 5.2.4 Estabilidade da atividade do sólido fermentado em solventes orgânicos

Neste trabalho, o objetivo principal é a síntese de ésteres, que é realizada em solventes orgânicos. Por isto, foi estudada a estabilidade do sólido fermentado pela determinação da sua atividade residual de esterificação, após incubação em solventes orgânicos com log P de - 0,76 a 4,0 por 24 h a 200 rpm.

As atividades residuais de esterificação foram calculadas em relação ao controle, sem pré-incubação nos solventes (FIGURA 20).

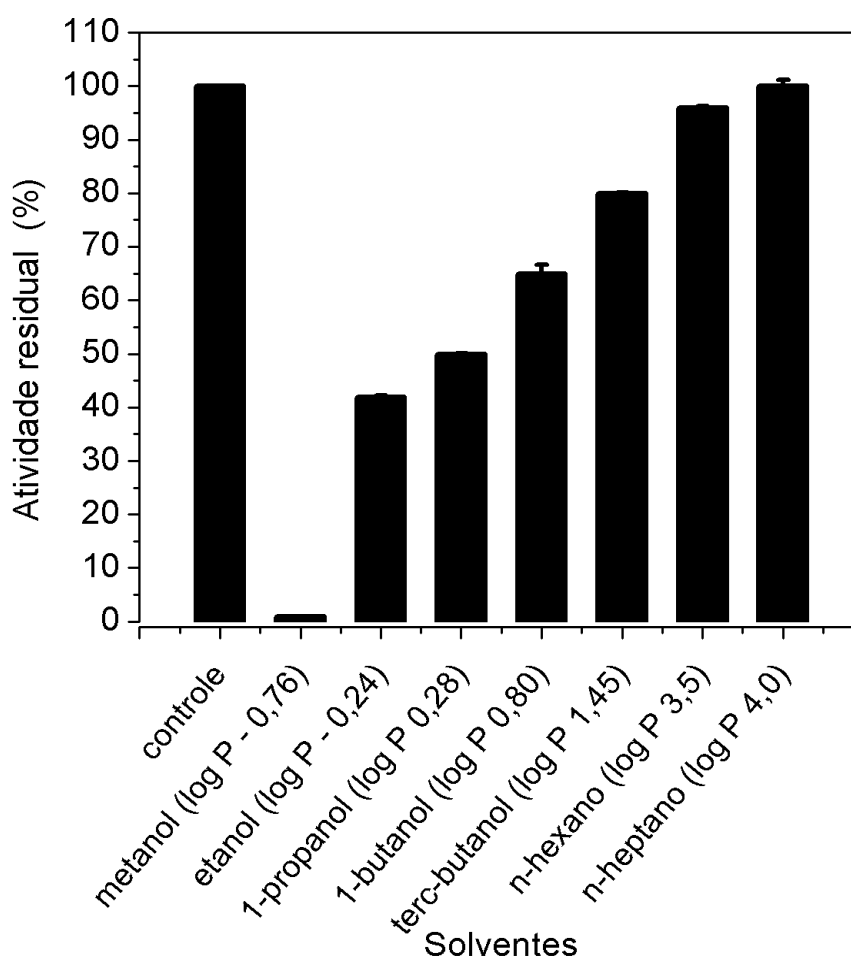


FIGURA 20 – ESTABILIDADE DA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO DE *Rhizopus microsporus* EM SOLVENTES ORGÂNICOS

Controle: sólido fermentado sem incubação. Condições de incubação: 5 mL de solventes, 0,5 g de sólido fermentado, a 200 rpm por 24 h a 30 °C. Determinação da atividade de esterificação: 5 mL de meio com 96% de *n*-heptano, razão molar 3:1 (etanol: ácido oleico) e 0,5 g de sólido fermentado, 200 rpm a 40 °C.  $p > 0,05$  para *n*-hexano e *n*-heptano. Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média.

As lipases do sólido fermentado apresentaram maior atividade residual em *n*-heptano (log P 4,0) e *n*-hexano (log P 3,5) (100%) (FIGURA 20). Com a incubação em *tert*-butanol (log P 1,45), a atividade residual foi de cerca de 80%, seguida de atividades residuais de 65, 50 e 42%, para 1-butanol, 1-propanol e etanol, respectivamente. A perda de atividade total quando se incubou o sólido com metanol pode estar relacionada com o pequeno tamanho da molécula deste álcool, que poderia acomodar-se mais facilmente no sítio ativo da lipase, provocando inibição ou desnaturação da enzima (GIRALDO; MORENO-PIRAJÁN, 2012; SHIMADA et al., 2002).

Os resultados obtidos nesta etapa, que mostram uma correlação da atividade residual com o parâmetro log P, seguem uma regra bem descrita na literatura para lipases, na qual a estabilidade da enzima é diretamente proporcional ao log P. Em geral, quanto maior é a hidrofiliicidade de um solvente (menor log P), maior é a sua afinidade para com a água, e, portanto, mais provável a remoção da camada essencial de água em torno da enzima, o que provoca perda de atividade enzimática (RAHMAN et al., 2005). Entretanto, esta regra pode não ser geral para lipases, e depende principalmente da fonte da enzima. Sun, Xu e Wang (2009) concluíram que não houve correlação entre a estabilidade da lipase de *R. chinensis* e o log P dos solventes testados. Eles produziram sólido fermentado utilizando uma mistura farelo e farinha de trigo e testaram o efeito de solventes na atividade de hidrólise da lipase purificada extraída do sólido fermentado. A enzima e o solvente orgânico foram misturados numa proporção de 1:1 e incubados a 30 °C, a 150 rpm, por 1 h, a atividade de hidrólise da lipase aumentou em 15, 34, 6 e 13% em metanol (log P - 0,76), etanol (log P - 0,24), *n*-hexano (log P 3,5) e isooctano (log P 4,5), respectivamente. Quando se incubou a enzima com os solventes 1-propanol (log P 0,28), clorofórmio (log P 2), *n*-nonano (log P 5,1) e *n*-heptano (log P 4,0), a atividade residual de hidrólise da lipase diminuiu para 83, 57, 39 e 50%, respectivamente.

Outros autores também não conseguiram relacionar a atividade residual da lipase com o log P dos solventes. Por isso, analisaram a estabilidade da lipase de acordo com as propriedades químicas dos solventes, relacionadas ao seu caráter apolar, polar próticos e polar aprótico. Hernández-Rodriguez et al. (2009) testaram o efeito de solventes orgânicos sobre a estabilidade da atividade de esterificação da lipase do sólido fermentado por *R. microsporus* var. *tuberosus* e

do sólido fermentado por *R. microsporus* var. *chinensis*. Eles produziram o sólido com o suporte perlita, um vidro vulcânico rico em sílica, a 45 °C por 20 h. O sólido fermentado seco (0,5 g) foi incubado em 1,5 mL de solvente a 25 °C. O sólido fermentado por *R. microsporus* var. *tuberosus* e sólido fermentado por *R. microsporus* var. *chinensis*, mantiveram atividades residuais de cerca de 80% em *n*-decano, um solvente apolar. A incubação em solventes polares apróticos acetona, acetato de etila e acetonitrila não afetou a atividade dos biocatalisadores. A atividade da lipase de *R. microsporus* var. *chinensis* em etanol, um solvente polar prótico, reduziu-se a 50%. Para os autores, a interação entre os solventes apróticos polares e a enzima manteve o nível de hidratação da lipase, que conservou a conformação necessária para a sua atividade.

#### 5.2.5 Especificidade da atividade de esterificação frente a diferentes ácidos graxos

Nesta etapa do trabalho, com objetivo de usar o sólido fermentado como catalisador da síntese de biodiesel, determinou-se a especificidade das lipases do sólido fermentado em relação ao comprimento da cadeia dos ácidos graxos nas reações de esterificação etílicas em *n*-heptano (FIGURA 21).

Altas conversões (cerca de 98% em 2 h, FIGURA 21A) foram obtidas para os ácidos graxos caprílico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico e oleico, com exceção do ácido linoleico, que proporcionou a menor conversão (cerca de 80%), provavelmente devido à presença da dupla insaturação neste ácido graxo. Isto se refletiu na atividade de esterificação, (FIGURA 21B), que foi estatisticamente igual ( $15 \text{ U g}^{-1}\text{SS}$ ,  $p > 0,05$ ) para os ácidos graxos que proporcionaram maior conversão, tendo sido menor para o ácido linoleico ( $9 \text{ U g}^{-1}\text{SS}$ ).

A seletividade da lipase ao tamanho da cadeia acila dos ácidos graxos é importante para definir o material que pode ser utilizado para a produção de biodiesel. Isto implica que, dependendo da composição do material graxo, podem ocorrer maiores ou menores conversões. De acordo com Yan et al. (2014), devido à seletividade das lipases, as conversões em éster para diferentes matérias-primas são diferentes e por isso, pode-se usar lipases combinadas, com diferentes seletividades, para a produção de biodiesel.

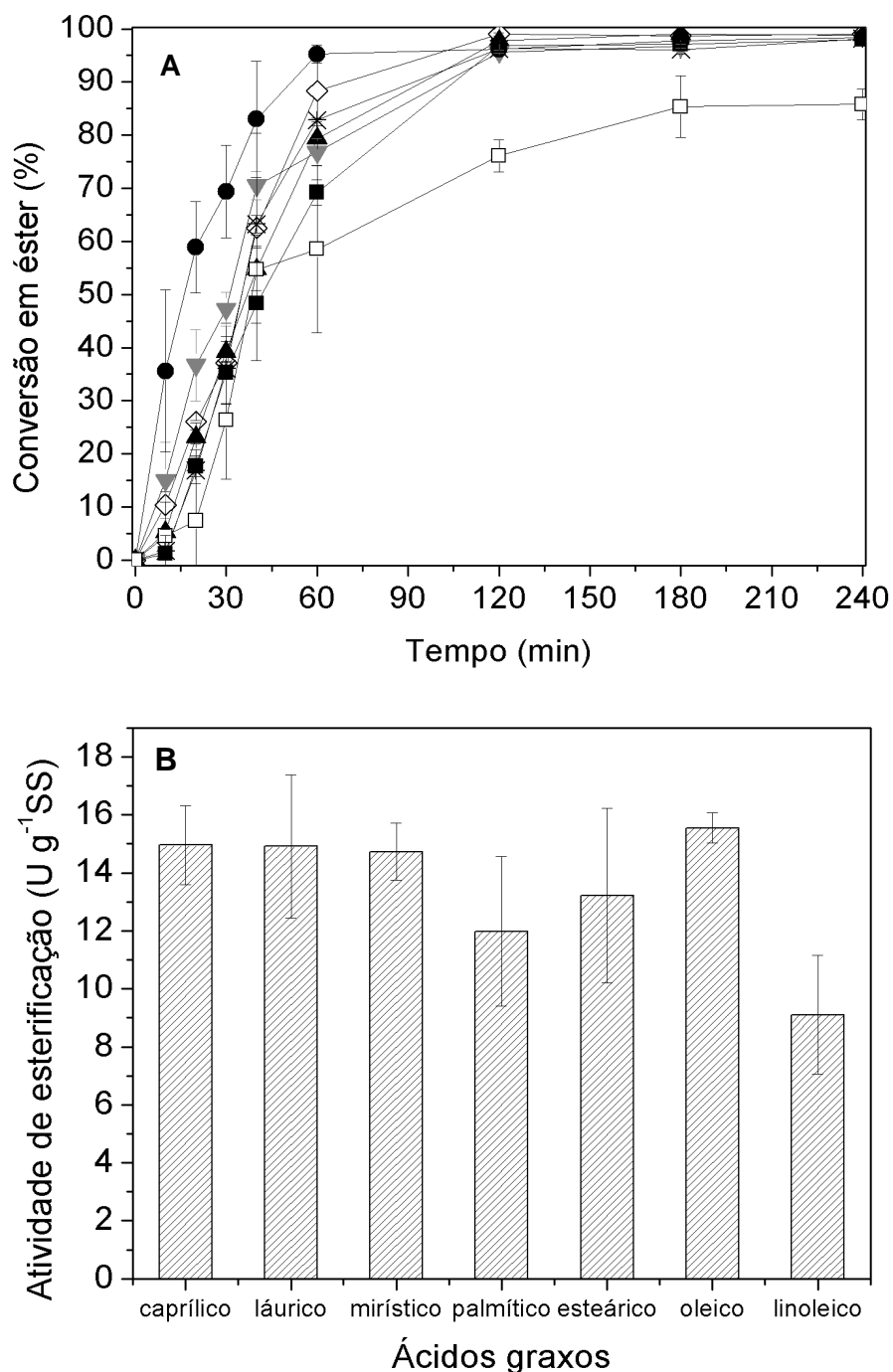


FIGURA 21 – REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADAS PELO SÓLIDO FERMENTADO DE *Rhizopus microsporus*

(A) Cinética de conversão em éster; (B) Atividade de esterificação. ( $\diamond$ ) C8 (ácido caprílico); ( $\star$ ) C12 (ácido láurico); ( $\blacktriangle$ ) C14 (ácido mirístico); ( $\blacktriangledown$ ) C16 (ácido palmítico); ( $\blacksquare$ ) C18 (ácido esteárico); ( $\bullet$ ) C18:1 (ácido oleico); ( $\square$ ) C18:2 (ácido linoleico). Condições: 5 mL de meio com 96% de *n*-heptano, razão molar 3:1 (etanol: ácido graxo), 0,5 g de sólido fermentado, 200 rpm por 240 min a 40 °C.  $p > 0,05$  para a atividade de esterificação de C8, C12, C14, C16, C18 e C18:1. Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média.



Outros autores também estudaram o comportamento das lipases de *Rhizopus* frente a diferentes ácidos graxos em reações de esterificação em solventes orgânicos. A preferência das lipases de *R. chinensis* produzidas por fermentação submersa (FS) (SUN; XU, 2009) e por FES (SUN; XU; WANG, 2009) foi avaliada para os ácidos butírico, capróico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico e palmítico. As lipases produzidas por FS e FES foram purificadas, liofilizadas e utilizadas para catalisar a síntese de ésteres, em meio reacional contendo etanol e *n*-heptano a 40 °C. Os autores dos dois trabalhos, relataram seletividade das lipases para o ácido caprílico, e atividade de esterificação de 49 U mg<sup>-1</sup> para a lipase produzida por FS e 138 U mg<sup>-1</sup> para a lipase produzida por FES.

#### 5.2.6 Estudo de reutilização do sólido fermentado em reações de esterificação em *n*-heptano

Para completar a caracterização do sólido fermentado, com vistas à sua aplicação na síntese de ésteres foi realizado um estudo de reutilização do sólido fermentado em ciclos de reações de esterificação do ácido oleico com etanol em *n*-heptano (FIGURA 22). A conversão em éster manteve-se em aproximadamente 100% em 23 ciclos reacionais, tendo diminuído para 86% a partir do 24º ciclo, mantendo-se estável até o 28º ciclo. Este resultado é promissor, pois mostra a estabilidade das lipases do sólido fermentado em reações de esterificação em presença de solvente, nestas reações, a razão sólido fermentado/ácido oleico utilizada é de 5 (g/g).

Os resultados obtidos neste trabalho para reações de esterificação em presença de um solvente hidrofóbico foram melhores do que os resultados obtidos por Fernandes et al. (2007) para o sólido fermentado de *B. cepacia* LTEB11 em reações de esterificação em *n*-heptano. Os autores relataram conversão inicial de 97%, que foi mantida por 10 ciclos, diminuindo para 48% após o 14º ciclo. A aplicação do sólido fermentado por *B. cenocepacia* como catalisador nas reações de transesterificação em *tert*-butanol foi relatada por Liu et al. (2013). A conversão inicial relatada pelos autores, 72%, diminuiu para 48% após o 3º ciclo reacional.

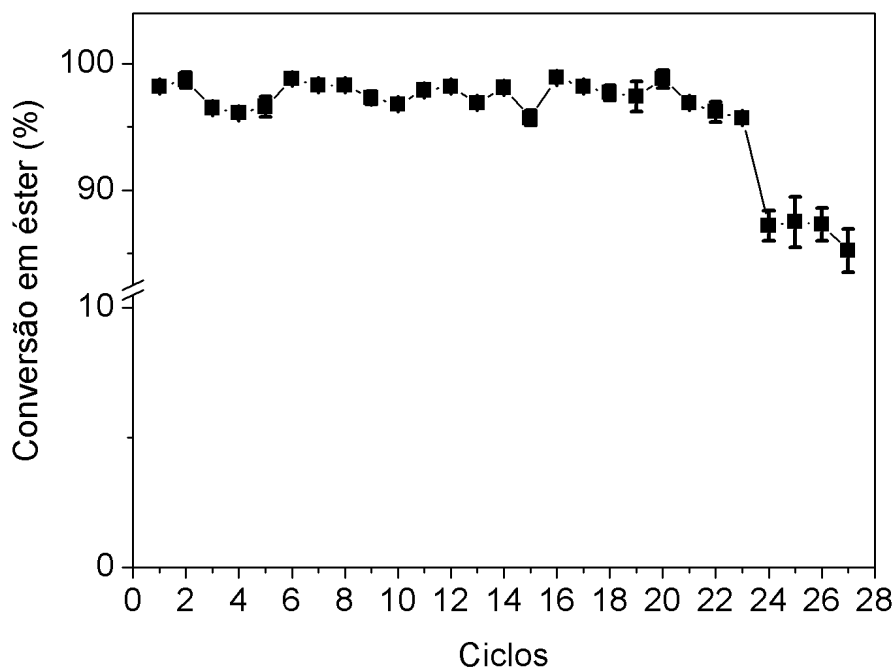


FIGURA 22 – REUTILIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO DE *Rhizopus microsporus* NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

Condições: 10 mL de meio com 96% de *n*-heptano, razão molar 3:1 (etanol: ácido oleico), 1 g de sólido fermentado, 200 rpm por 240 min a 40 °C. Os valores apresentados representam as médias das análises em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média.

A presença de *n*-heptano pode tornar a lipase mais estável, visto que os solventes hidrofóbicos protegem a atividade enzimática por que não removem a camada de água de hidratação necessária para a atividade enzimática; além disso, nestes sistemas, os substratos, ácidos graxos e álcool, estão em menor concentração (HAMA; KONDO, 2013). Porém, é mais interessante, em processos de síntese de biodiesel, encontrar lipases que se mantenham estáveis em sistema livre de solventes, onde a concentração dos substratos é maior.

### 5.3 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÉSTERES EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES, EM FRASCOS AGITADOS

Tendo em vista que a presença de solventes como *n*-heptano, que apesar de protegerem a atividade enzimática, podem aumentar os custos do processo enzimático de síntese de biodiesel, nesta etapa realizaram-se estudos de

otimização da síntese de ésteres via reação de esterificação em sistema livre de solventes, ou seja, no qual os próprios substratos etanol e ácidos graxos compõem o meio reacional. Nestas reações, a razão sólido fermentado/ácido oleico utilizada é de 0,2 (g/g).

### 5.3.1 Efeito do comprimento da cadeia do álcool

Nesta etapa, investigou-se o efeito do comprimento da cadeia de álcoois mono-hidroxilados, de 1 a 6 átomos de carbono, nas reações de esterificação em sistema livre de solventes (FIGURA 23). Para prevenir o efeito inibitório, o álcool foi sempre adicionado em duas etapas, no início e após 24 h de reação (ZAGO et al., 2014).

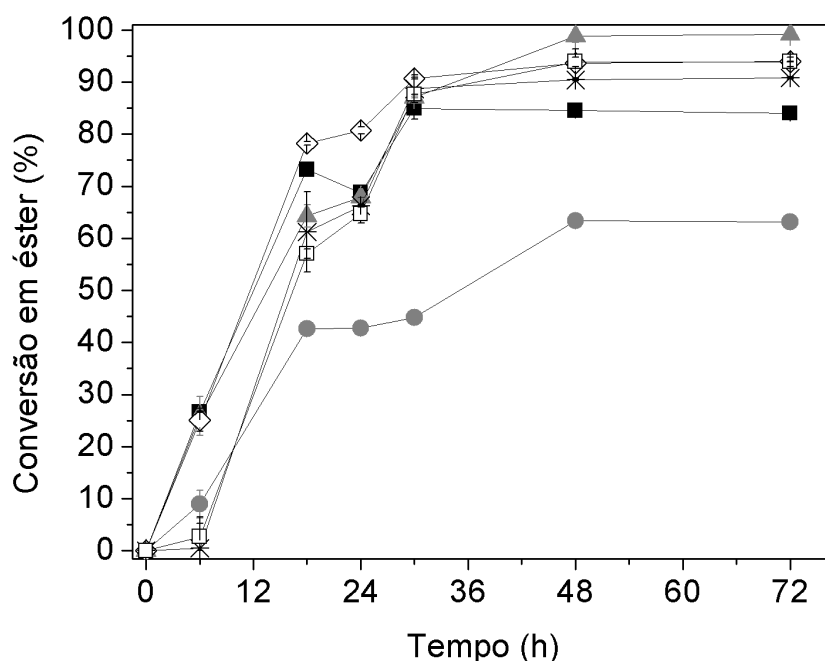


FIGURA 23 – CINÉTICA DE REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADAS PELO SÓLIDO FERMENTADO DE *Rhizopus microsporus* EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES UTILIZANDO DIFERENTES ÁLCOOIS E ÁCIDO OLEICO

(●) metanol; (■) etanol; (▲) 1-propanol; (◊) 1-butanol; (☆) 1-pentanol; (□) 1-hexanol. Condições: 90 mmol de álcool, 30 mmol de ácido oleico (3:1), 1,8 g sólido fermentado, 200 rpm a 40 °C. Os álcoois foram adicionados em 0 e 24 h. Os valores apresentados representam as médias das análises em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média.  $p > 0,05$  em 48 h e 72 h para: oleato de propila, oleato de butila, oleato de pentila e oleato de hexila.

As reações de esterificação, para todos os álcoois testados, atingiram equilíbrio ao fim de 48 h (FIGURA 23). Os melhores resultados de conversão foram obtidos quando se utilizou álcoois de cadeia acima de 3 átomos de carbono, como o oleato de propila (99%), oleato de butila e oleato de hexila (94%) e oleato de pentila (90%); relativamente menores conversões foram obtidas para o oleato de etila (85%) e oleato de metila (63%).

Os resultados obtidos nesta etapa estão de acordo com a literatura. De acordo com Koda et al. (2010), Nouredдини, Gao e Philkana (2005) e Shimada et al. (2002), na produção de biodiesel por via enzimática, álcoois de cadeia curta além de desnaturarem algumas enzimas, pois removem com mais facilidade a água de solvatação das enzimas, podem causar inibição competitiva em lipases; neste caso, moléculas do álcool se ligam reversivelmente ao sítio ativo da enzima, diminuindo o acesso do substrato hidrofóbico. Em contrapartida, os álcoois de maior cadeia carbônica podem não produzir o mesmo efeito devido a sua massa molar superior (YAN et al., 2014). Estes álcoois, como 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol e 1-hexanol têm maior solubilidade ao substrato, e são mais compatíveis com as enzimas.

Outros estudos foram publicados sobre o efeito de álcoois na síntese de biodiesel por via enzimática. Salis et al. (2005), usaram lipase de *Pseudomonas cepacia* para catalisar reações de transesterificação da trioleína com diferentes álcoois, a 40 °C, e relataram conversões acima de 90% para 1-butanol, *n*-propanol e etanol e conversões de apenas 40% para o metanol. Ciudad et al. (2011) usaram células inteiras de *R. oryzae* para catalisar a transesterificação do óleo de canola. Obtiveram conversões de 50% de éster metílico e 70% de éster etílico após 144 h, a 20 °C. Por outro lado, Pazouki et al. (2010) relataram conversões relativamente elevadas (88%) quando o metanol foi utilizado em reação de esterificação dos ácidos graxos de óleo de cozinha usado a 35 °C por 72 h, usando células inteiras de *R. oryzae* imobilizadas (BSP, *biomass support particles*). Zhong et al. (2013) usaram lipase de *Candida sp.* 99-125 para catalisar reações de esterificação do ácido oleico com diferentes álcoois, em sistema livre de solventes e relataram conversões de 15, 82, 83 e 88% para metanol, etanol, *n*-propanol e *n*-butanol, respectivamente.

Os resultados obtidos nesta etapa indicam que o sólido fermentado de *R. microsporus* pode ser usado com sucesso para a síntese de vários ésteres de

importância industrial. De acordo com a literatura, ésteres de álcoois de cadeia longa como o oleato de butila também podem ser usados como aditivos do biodiesel, pois, além da melhora das propriedades de fluxo a frio, o seu uso pode melhorar a qualidade de ignição do biodiesel (GRYGLEWICZ; MUSZYNSKI; NOWICKI, 2013; SALIMON; SALIH; YOUSIF, 2012; KNOTHE et al., 2006; GHAMGUI; KARRA-CHAABOUNI; GARGOUR, 2004; LINKO et al., 1995). Além disso, os álcoois de cadeias maiores são usados para produzir biodiesel com propriedades superiores a baixas temperatura, por exemplo, menor cristalização a baixas temperatura (NIELSEN; BRASK; FJERBAEK, 2008). Uma desvantagem do uso de álcoois de maior cadeia carbônica, como 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol e 1-hexanol, para a produção de biodiesel é o seu custo elevado. De acordo com Nielsen, Brask e Fjerbaek (2008), parte do custo adicional de um álcool de maior cadeia, pode ser compensada pelo ganho com aumento da massa do biodiesel.

Dentre os álcoois estudados nesta etapa, o etanol foi escolhido para dar sequência aos estudos deste trabalho, pois é obtido de fonte renovável e é menos tóxico. Do ponto de vista econômico, o uso do etanol pode ser uma grande vantagem para os países sem recursos de gás natural, uma vez que este pode ser obtido da fermentação da cana-de-açúcar. Além disto, o etanol é favorável ao meio ambiente e é abundante no Brasil (VÉRAS et al., 2011).

### 5.3.2 Determinação da atividade residual do sólido fermentado durante a reação de síntese do oleato de etila

A reação de síntese do oleato de etila entrou em equilíbrio quando a conversão era 85% (FIGURA 23). Por isso, investigou-se a estabilidade da atividade do sólido fermentado durante esta reação. Para tanto, o sólido fermentado foi recuperado da reação e analisou-se a sua atividade residual de esterificação (FIGURA 24). A reação apresentou velocidade inicial elevada, e atingiu o estado estacionário em cerca de 30 h, com 85% de conversão (FIGURA 23), confirmando resultados mostrados na FIGURA 24 para o etanol. No mesmo experimento, a maior perda de atividade do sólido (35%) ocorreu nas primeiras 6 h de reação e, após este período, a lipase permaneceu estável, com 65% de atividade residual por até 72 h.

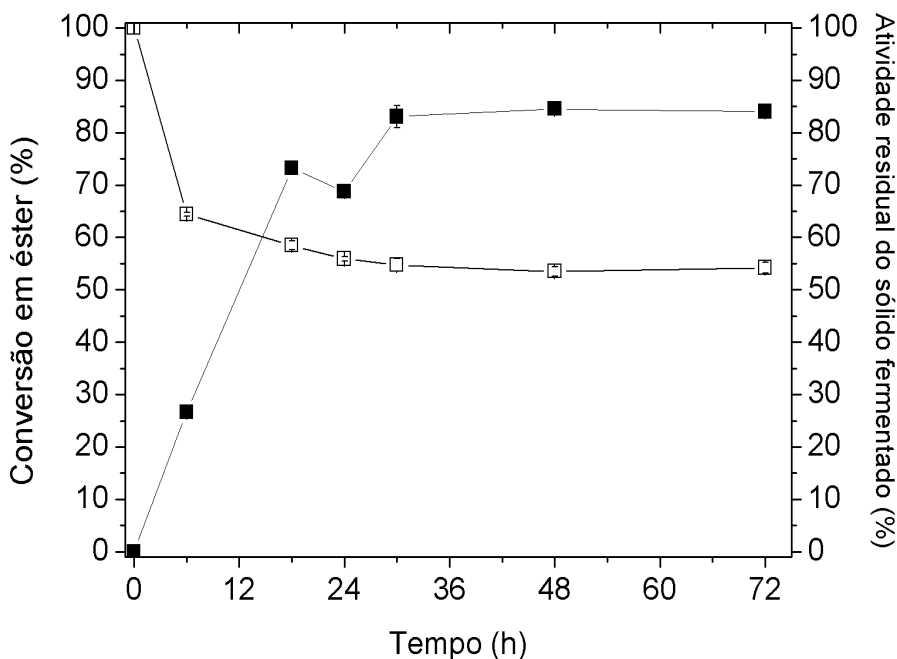


FIGURA 24 – ATIVIDADE RESIDUAL DO SÓLIDO FERMENTADO DE *Rhizopus microsporus* DURANTE A CINÉTICA DA REAÇÃO DE SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES

(■) oleato de etila; (■) atividade residual de esterificação do sólido fermentado. Condições reacionais da esterificação: 90 mmol de álcool, 30 mmol de ácido oleico (3:1), 1,8 g sólido fermentado, 200 rpm a 40 °C. O etanol foi adicionado em 0 e 24 h. Determinação da atividade de esterificação: 5 mL de meio com 96% de *n*-heptano, razão molar 3:1 (etanol: ácido oleico) e 0,5 g de sólido fermentado, 200 rpm a 40 °C.

Os resultados deste experimento sugerem que a lipase seja parcialmente desnaturada pelo etanol, mas que grande parte da enzima é inibida competitivamente pelo etanol durante a reação (AL-ZUHAIR; LIG; JUN, 2007; YADAV; DEVI, 2004), uma vez que 65% da atividade permanecem no sólido fermentado após 30 h, quando reação entra em equilíbrio.

### 5.3.3 Efeito do teor em água

Neste trabalho, estudou-se a influência da adição e da remoção de água por peneira molecular na reação de síntese do oleato de etila (FIGURA 25).

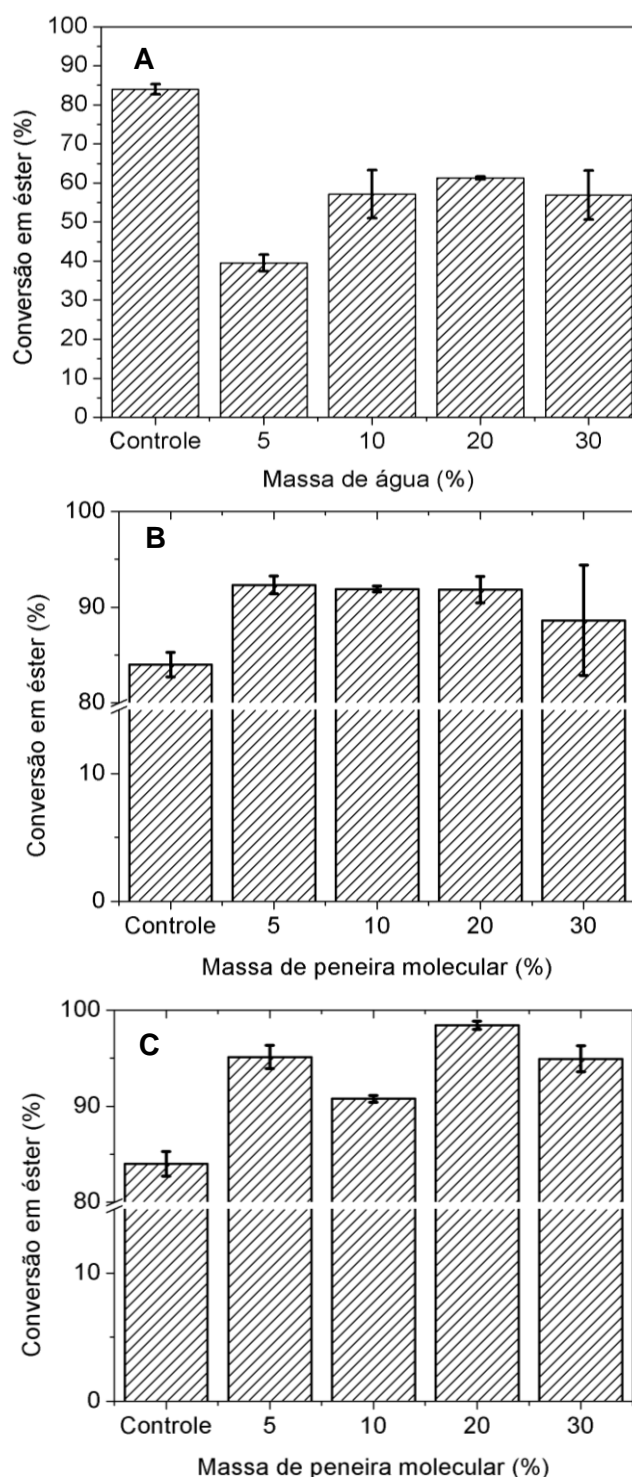


FIGURA 25 – EFEITO DO TEOR DE ÁGUA NAS REAÇÕES DE SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE *Rhizopus microsporus* EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES

(A) adição de água; (B) adição de peneira molecular (início da reação); (C) adição de peneira molecular (24 h). Controle: sem adição de água ou peneira molecular. Condições reacionais da esterificação: 90 mmol de álcool, 30 mmol de ácido oleico (1:3), 1,8 g sólido fermentado, 200 rpm por 48 h a 40 °C. O etanol foi adicionado em 0 e 24 h. Água e peneira molecular: 5% a 30% (m/m) (com base na massa (g) do ácido oleico e do etanol). Os valores apresentados representam as médias das análises em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média.  $p > 0,05$  em (B): 5%, 10%, 20% e 30%;  $p > 0,05$  em (C): 20% e 30%.

Quando 5% de água foram adicionados ao meio reacional (FIGURA 25A), houve redução na conversão de ácido oleico, tendo sido obtidos 39% de conversão, comparados a 85% obtidos quando a água não foi adicionada ao meio (controle - com 10% de umidade no sólido fermentado). Neste caso, é possível pressupor-se que, em baixas quantidades, a água pode estar dispersa no meio reacional ou adsorvida no sólido fermentado (SOARES, 2014), o que possivelmente favoreceu a reação de hidrólise. Entretanto, a adição de 10% a 30% de água levou a conversões superiores, cerca de 60%, e, neste caso, observou-se visualmente a formação de duas fases no meio reacional.

A remoção de água com a adição de 20% de peneira molecular no início da reação (FIGURA 25B) levou a um aumento da conversão de 85% (controle, sem adição de peneira molecular) para 92%. Neste experimento, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para os resultados obtidos com adição de 5 a 30% de peneira molecular. Por outro lado, quando a peneira molecular (20%) foi adicionada após 24 h de reação (FIGURA 25C), houve um aumento da conversão de 85% para 98% em 48 h de reação.

Um efeito semelhante ao obtido nesta etapa foi encontrado por Meng et al. (2011), que realizaram reações de esterificação de hidrolisados de óleo de soja catalisadas pela lipase de *Yarrowia lipolytica* com adição de peneira molecular. Os autores observaram que a adição de 9% de peneira molecular resultou em um aumento da conversão de 85% para 90%.

A relevância do conteúdo de água em reações de síntese catalisadas por lipases tem sido destacada na literatura. De acordo com Meng et al. (2011), a água tem papel duplo nestes sistemas: é essencial para a manutenção da conformação cataliticamente ativa da lipase, mas, em reações de esterificação, como a água é um dos produtos, pode deslocar o equilíbrio da reação em favor da reação de hidrólise. No caso de adição de água nos sistemas reacionais de esterificação, em teores mais elevados de água, o sistema se torna bifásico e a água produzida na reação de esterificação migra para a fase aquosa. Uma vez removida a água do meio reacional orgânico, o equilíbrio da reação é deslocado no sentido da síntese (SOARES, 2014; ATADASHI et al., 2012; FORESTI et al., 2007). Outros autores recomendam a remoção da água formada durante a reação de esterificação por adição de glicerol (WATANABE et al., 2007) como um meio de deslocar o equilíbrio a favor da reação de síntese. Os autores relataram que o



glicerol removeu a água presente no meio reacional, o que resultou em um aumento na conversão em ésteres metílicos. Entretanto, o glicerol, apesar de ter um custo inferior a peneira molecular pode aderir ao catalisador, causando problemas de transferência de massa, e consequentemente, redução nas conversões, como observado anteriormente para reações de transesterificação (SALUM et al., 2010).

Recentemente, Adachi et al. (2013) realizaram adições de 5% de água durante a reação de esterificação de hidrolisados do óleo de palma catalisada por BSP - *Biomass support particles* (células inteiras imobilizadas) de r-CALB e relataram que esta quantidade de água adicionada não aumentou a produção de ésteres.

Existem poucos relatos na literatura sobre o efeito da água em reações nas quais sólidos fermentados são utilizados como catalisador, e, além disto, a complexidade da composição do sólido fermentado e do sistema reacional dificulta a comparação dos resultados. Estudos de equilíbrio termodinâmico da reação de esterificação realizados por Soares (2014) indicaram que o sólido fermentado sorveu componentes hidrofílicos e hidrofóbicos do meio de reação. Os autores verificaram que diversos fatores, tais como umidade inicial do sólido fermentado, agitação do sistema reacional, além do etanol e da água que estão adsorvidos no sólido com concentração elevada, influenciam na conversão de equilíbrio, que diminui com o aumento da sorção dos componentes hidrofílicos no sólido fermentado de *B. cepacia* LTEB11.

#### 5.3.4 Otimização da síntese de ésteres etílicos por planejamento fatorial

Nesta etapa, buscou-se otimizar um processo de baixo custo, e por isso, a peneira molecular, apesar de ter proporcionado bons resultados, não foi incorporada no sistema reacional. Foi realizado um planejamento fatorial  $2^2$ , com dois níveis e duas variáveis, com ponto central em triplicata (BRUNS; BARROS NETO; SCARMINO, 2001). Utilizaram-se dois materiais de partida: o ácido oleico, que já havia sido utilizado anteriormente, e a mistura de ácidos graxos obtida de *soapstock*, a borra ácida do processamento do óleo de soja - AGBS

(SOARES et al., 2013). As variáveis independentes estudadas foram a temperatura e a razão molar (RM, etanol: ácido graxo).

Na TABELA 11 estão mostrados os resultados experimentais para a conversão do ácido oleico e dos AGBS em 48 h de reação.

Para determinar-se a importância das variáveis temperatura e razão molar na resposta (% conversão), a partir dos resultados obtidos para o ponto central (TABELA 11, experimentos 5-7), calculou-se o desvio padrão para a conversão em éster,  $\pm 0,4$  para a conversão do ácido oleico e  $\pm 0,9$  para conversão de AGBS. O efeito da variável será tanto mais significativo quanto maior for a diferença entre o desvio-padrão obtido e o valor encontrado para o efeito (BRUNS; BARROS NETO; SCARMINO, 1996).

TABELA 11 – DELINEAMENTO FATORIAL  $2^2$  APLICADO NA OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE *Rhizopus microsporus*

Ensaio	Variáveis independentes		Conversão	Conversão
			Material de partida: ácido oleico (%)	Material de partida: AGBS (%)
	T (°C)	RM	*Observado	*Observado
1	40 (- 1)	1:1 (- 1)	88,9	81,9
2	50 (1)	1:1 (- 1)	83,1	73,8
3	40 (- 1)	5:1 (1)	93,5	84,1
4	50 (1)	5:1 (1)	87,1	82,2
5	45 (0)	3:1 (0)	88,9	81,3
6	45 (0)	3:1 (0)	89,0	82,0
7	45 (0)	3:1 (0)	88,3	80,3

\*Conversão de éster após 48 h de reação a 200 rpm.

A concentração de ácidos graxos em cada experimento foi de 30 mmol.

AGBS: mistura de ácidos graxos da borra de soja.

O desvio padrão calculado para o ponto central para o ácido oleico foi de  $\pm 0,4$  e para o ponto central de AGBS foi de  $\pm 0,9$ .

T: temperatura de reação.

RM: razão molar de etanol: ácidos graxos.

As equações ajustadas para a conversão do ácido oleico (EQUAÇÃO 7) e de AGBS (EQUAÇÃO 8) estão descritas abaixo:

$$\hat{Y} = 88,4286 - 3,25T + 2,25RM, \quad (7)$$

$$\hat{Y} = 80,7143 - 2,50T + 2,50RM, \quad (8)$$

onde:  $\hat{Y}$  é o valor previsto de o teor de éster obtido (%) e T e RM representam os valores codificados (ex: - 1; 0; 1) para as variáveis independentes temperatura e razão molar, respectivamente.

Para a conversão do ácido oleico, as duas variáveis (T, RM) apresentaram influência na conversão, pois os valores dos efeitos foram superiores ao do desvio-padrão característico da correspondente variável-resposta ( $\pm 0,4$ ) (TABELA 12). O efeito mais significativo ( $- 6,1 \pm 0,4$ ) foi da temperatura, que afeta negativamente a conversão. Quando a temperatura passa de 50 °C (nível mais) para 40 °C (nível menos) verifica-se um aumento de 6,1 pontos percentuais na conversão. A razão molar apresentou um efeito positivo na conversão; quando RM passa de 1:1 (nível menos) para 5:1 (nível mais), verifica-se um aumento de 4,3 pontos percentuais na conversão. Desta forma, a conversão do ácido oleico é máxima com a menor temperatura e maior a RM etanol: ácido oleico.

Analisando-se o efeito secundário, ou seja, aquele resultante da interação entre duas variáveis, verifica-se um valor de  $- 0,3 \pm 0,4$  para a interação T x RM. Este efeito não foi significativo, visto que seu valor foi menor que o desvio padrão, ou seja, não houve interação entre as duas variáveis.

Para a conversão de AGBS, observa-se que as duas variáveis (T e RM) foram significativas, pois os valores dos efeitos foram superiores ao do desvio padrão característico da correspondente variável-resposta ( $\pm 0,9$ ) (TABELA 12). Similarmente aos efeitos obtidos para o ácido oleico, o efeito das duas variáveis independentes é contrário: o aumento da temperatura leva à diminuição e o aumento da razão molar leva a um aumento da conversão. No caso da conversão

de AGBS, o efeito de interação entre as duas variáveis (T x RM) foi significativo ( $+ 3,1 \pm 0,9$ ), o que mostra que o modelo matemático não se ajusta satisfatoriamente aos resultados. O efeito de interação entre as duas variáveis impede a obtenção de um bom modelo (BRUNS; BARROS NETO; SCARMINO, 1996).

TABELA 12 – VALORES DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS PRINCIPAIS E SECUNDÁRIAS DO DELINEAMENTO FATORIAL SOBRE A VARIÁVEL-RESPOSTA CONVERSÃO EM ÉSTER

Variáveis	Efeitos (p.p.) <sup>a</sup>	Efeitos (p.p.) <sup>a</sup>
	Conversão em éster ácido oleico (%)	Conversão em éster AGBS (%)
T (°C)	- 6,1 $\pm$ 0,4	- 5,0 $\pm$ 0,9
RM	+ 4,3 $\pm$ 0,4	+ 5,3 $\pm$ 0,9
T x RM	- 0,3 $\pm$ 0,4	+ 3,1 $\pm$ 0,9

<sup>a</sup> p.p. = pontos percentuais. T = temperatura; RM = razão molar (etanol: ácido graxo).

Os resultados da TABELA 11 foram submetidos à análise de variância (ANOVA), que está mostrada nas TABELAS 13 e 14, para o ácido oleico e AGBS respectivamente. Para o ácido oleico, o valor da relação da média quadrática (regressão/resíduos) foi estatisticamente significativo ( $F > F$  tabelado) ao nível de 95% (TABELA 13). Além disso, o valor da relação entre a falta de ajuste e o erro puro não foi estatisticamente significativo ( $F < F$  tabelado) ao nível de 95%, o que indica que o modelo matemático (com  $R^2 = 0,98$ ) foi adequado para representar os dados experimentais. A boa concordância entre o percentual de variância explicada (98,08%) e o percentual máximo de variância explicável (98,95%), indica que o modelo é adequado para representar as relações reais entre os parâmetros selecionados da reação de esterificação do ácido oleico. Por outro lado, os resultados da ANOVA para a conversão de AGBS (TABELA 14) mostraram um baixo coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,81$ ), sendo que a diferença entre os parâmetros F calculado e F tabelado também não foi estatisticamente significativa ao nível de 95%, o que indica que modelo

matemático não se ajusta aos resultados experimentais, confirmando os resultados anteriores que mostraram interação entre as duas variáveis.

TABELA 13 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A CONVERSÃO DO ÁCIDO OLEICO

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F	$F_{tab95\%}$
Regressão	62,4926	2	31,2463	102,30	6,94
Resíduos	1,2217	4	0,3054		
Falta de ajuste	0,5551	2	0,2775	0,83	19,00
Erro puro	0,6667	2	0,3333		
TOTAL	63,7143	6			

% de Variância Explicada = 98,08

% de Máxima Variância Explicável = 98,95

$R^2 = 0,98$ ; SQ: Soma quadrática; GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática.

TABELA 14 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A CONVERSÃO DA MISTURA DE ÁCIDOS GRAXOS DA BORRA DE SOJA (AGBS)

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F	$F_{tab95\%}$
Regressão	50,0028	2	25,0014	8,75	6,94
Resíduos	11,4258	4	28,564		
Falta de ajuste	9,4258	2	4,7129	4,71	19,00
Erro puro	2,0000	2	10000		
TOTAL	61,4286	6			

% de Variância Explicada = 81,39

% de Máxima Variância Explicável = 96,74

$R^2 = 0,81$ ; SQ: Soma quadrática; GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática.

Com base nos resultados obtidos, para melhor visualização dos efeitos, foi construído um gráfico de superfície de resposta para a conversão do ácido oleico (FIGURA 26). Para o ácido oleico, o maior teor de éster é previsto quando a razão molar é elevada e mais baixa é a temperatura (93,5% de conversão com RM de

5:1 a 40 °C). Para ambos os substratos, observou-se que não existe um ponto de máxima conversão na região experimental estudada, o que indicou que poderia haver condições experimentais onde a conversão em éster ainda poderia ser aumentada. Com base nestes resultados e devido ao fato de que uma conversão mínima de 96,5% (teor de éster para biodiesel especificado pela ANP Nº 45 de 2014 (BRASIL, 2014) não foi prevista pelos modelos, prosseguiu-se com os estudos de otimização da síntese de ésteres por reação de esterificação do ácido oleico e de AGBS, em estudos univariados, aumentando-se a RM para 10:1 e 15:1 (etanol:ácido graxo) (FIGURA 27) e diminuindo-se a temperatura da reação para 35 °C (FIGURA 28).

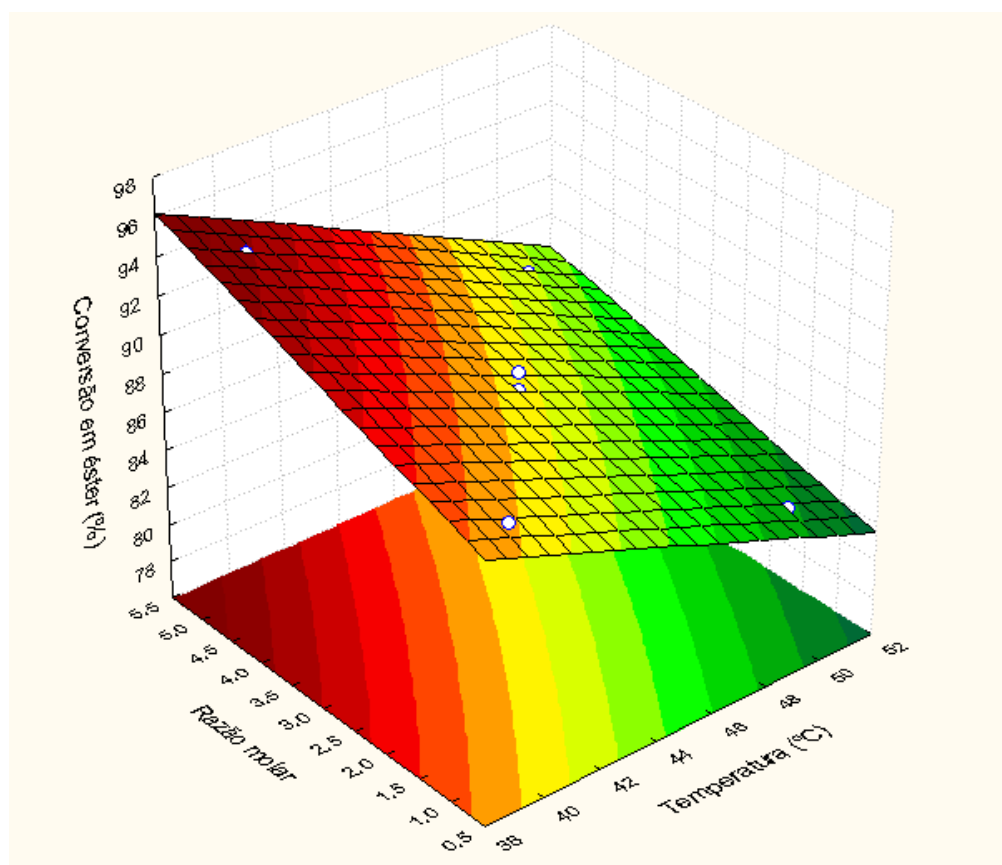


FIGURA 26 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE *Rhizopus microsporus*

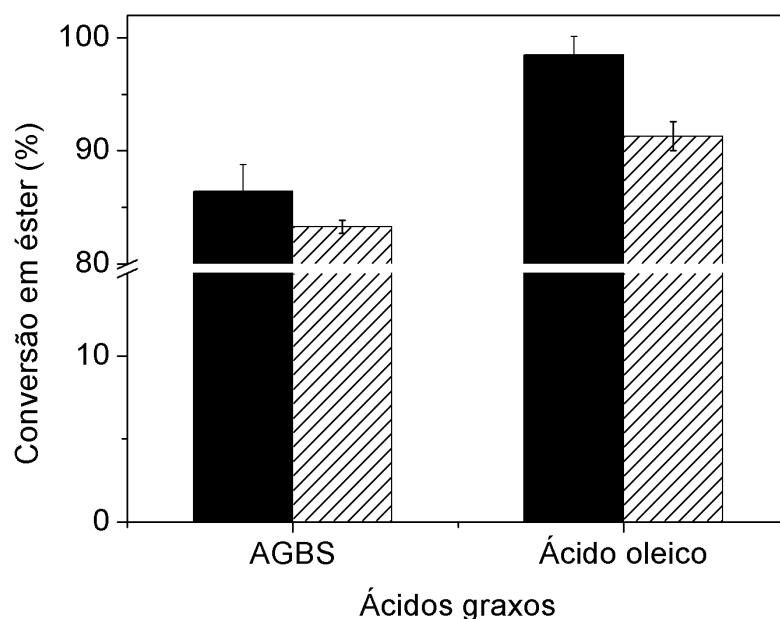


FIGURA 27 – EFEITO DA RAZÃO MOLAR NAS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADAS PELO SÓLIDO FERMENTADO DE *Rhizopus microsporus* EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES

(■): razão molar 10:1 e (▨): razão molar 15:1 (etanol: ácido graxo). Condições reacionais: 30 mmol de ácido graxo, 1,8 g sólido fermentado, 200 rpm por 48 h a 40 °C. O etanol foi adicionado em 0 e 24 h.  $p > 0,05$  para a conversão dos AGBS.

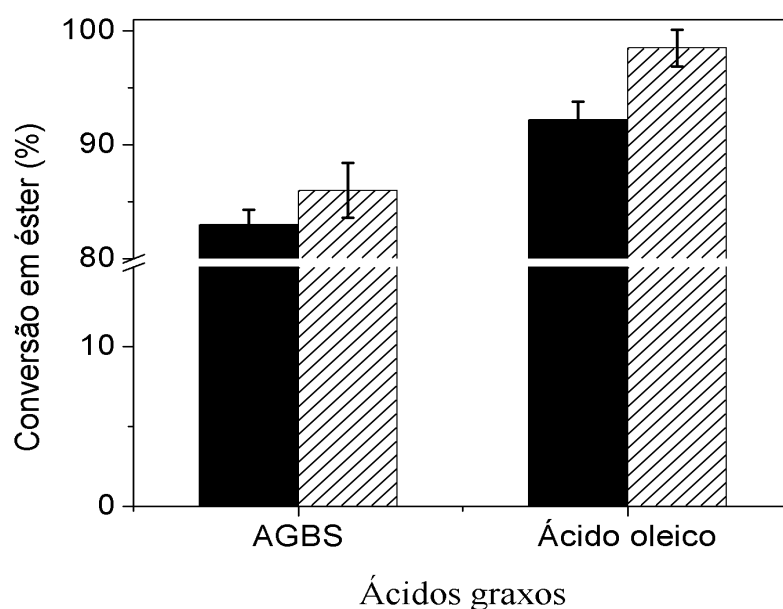


FIGURA 28 – EFEITO DA TEMPERATURA NAS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADAS PELO SÓLIDO FERMENTADO DE *Rhizopus microsporus* EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES

(■): 35 °C; (▨): 40 °C. Condições reacionais: 300 mmol de etanol, 30 mmol de ácido graxo (10:1), 1,8 g sólido fermentado, 200 rpm por 48 h. O etanol foi adicionado em 0 e 24 h.  $p > 0,05$  para a conversão dos AGBS.

A FIGURA 27 mostra que as mais altas conversões (98%, e 86%) foram obtidas com RM de 10:1, para ambos os materiais de partida. Entretanto, a diminuição da temperatura não levou a um aumento da conversão para AGBS, e no caso do ácido oleico, houve uma diminuição de 6% da conversão (FIGURA 28). Neste caso, a mais alta temperatura pode ter favorecido a conversão em éster pela redução da viscosidade do meio, facilitando a difusão dos substratos.

#### 5.4 PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES, EM BIORREATOR DE LEITO FIXO

Reatores de leito fixo com enzimas imobilizadas para produção de biodiesel têm sido utilizados em vários estudos, devido às diversas vantagens econômicas e operacionais deste sistema, como a possibilidade de reutilização da enzima sem a necessidade de separação do meio reacional e minimização dos danos do biocatalisador, devido à menor tensão de cisalhamento. Os experimentos foram realizados com AGBS como material de partida, por ser obtido de material de baixo custo, e para comparação com resultados anteriores de Soares et al. (2013). Estes autores relataram a produção de ésteres etílicos em leito fixo a partir de reações de esterificação utilizando AGBS, catalisadas pelo sólido fermentado de *B. cepacia* LTEB11, tendo sido obtidos 92% de conversão em 31 h.

##### 5.4.1 Efeito da temperatura

Nesta etapa, testaram-se as temperaturas de 40, 45 e 50 °C para as reações de esterificação de AGBS com etanol no reator de leito fixo preenchido com sólido fermentado (FIGURA 29).

Para estes experimentos, foram utilizados as mesmas condições do ensaio de melhor conversão da etapa de otimização de esterificação em frascos agitados, porém, com um aumento de 6 vezes na escala em decorrência do tamanho do leito do biorreator. Para isto, 83 g de etanol e 50 g de AGBS,



equivalentes a razão molar 10:1 (etanol:AGBS) foram utilizados nos ensaios. Os substratos foram continuamente recirculados pelo leito contendo 10,8 g de sólido fermentado (base seca), conforme descrito em 4.6. A vazão de recirculação de 5 mL min<sup>-1</sup> foi escolhida com base em trabalhos anteriores. Soares et al. (2013) e Salum et al. (2010) estudaram o efeito de diferentes vazões de recirculação da mistura reacional através do leito fixo (0,25 a 10 mL min<sup>-1</sup>) em relação à conversão dos substratos em éster e relataram que variação da faixa de vazão utilizada não foi suficiente para influenciar na conversão em éster.

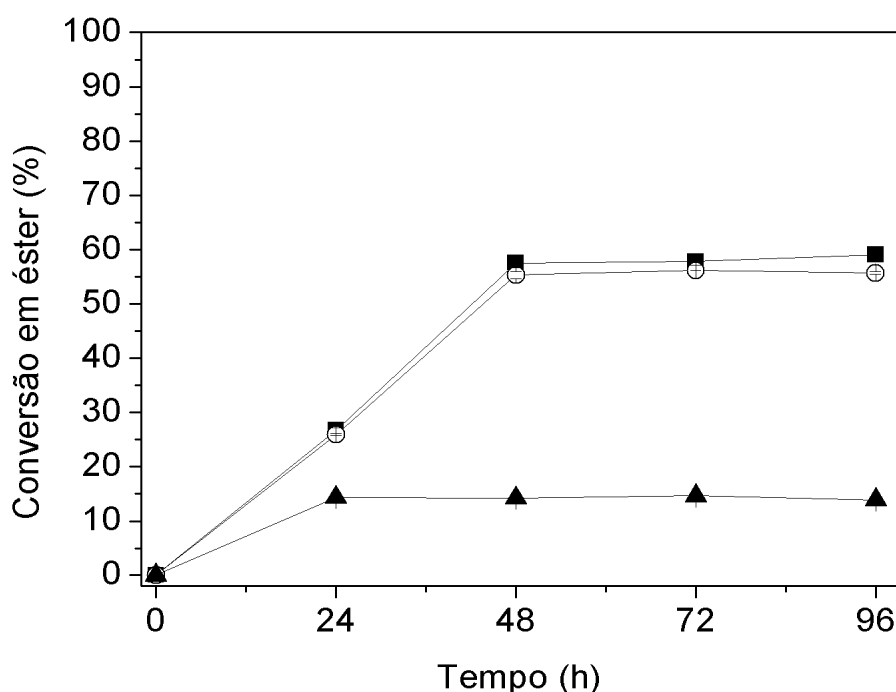


FIGURA 29 – EFEITO DA TEMPERATURA NAS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADAS PELO SÓLIDO FERMENTADO DE *Rhizopus microsporus* EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES EM BIORREATOR DE LEITO FIXO

Ensaios realizados com recirculação dos substratos. Temperatura da reação: (■) 40 °C; (○) 45 °C; (▲) 50 °C. Condições: 83 g de etanol, 50 g de AGBS (razão molar etanol: AGBS 10:1), 10,8 g sólido fermentado (base seca), vazão de recirculação 5 mL min<sup>-1</sup>. O etanol foi adicionado em 0 e 24 h. Os valores apresentados representam as médias das análises em duplicata  $\pm$  o erro padrão da média.

Observou-se que os perfis de conversão para as reações a 40 e 45 °C foram similares (FIGURA 29), com a máxima conversão (58%) obtida em 48 h,

com produtividade de  $60 \text{ mg g}^{-1}\text{SS h}^{-1}$ . A  $50^\circ\text{C}$ , a conversão obtida foi menor, com apenas 14% em 24 h mantendo-se em equilíbrio até 96 h.

Os resultados obtidos em reações realizadas em frascos agitados foram superiores, usando as mesmas condições. Foram obtidas produtividade de  $102 \text{ mg g}^{-1}\text{SS h}^{-1}$  e conversão de 86% para AGBS, na razão molar de 10:1 (etanol: ácido graxo) em 48 h, a  $40^\circ\text{C}$ . Portanto, no biorreator de leito fixo obteve-se produtividade 41% menor e conversão 34% menor do que os obtidos nas mesmas condições em frascos agitados.

Estes resultados indicam que outro tipo de biorreatores, como, o reator de batelada tipo tanque agitado (STR - *Stirred Tank Reactor*) pode ser mais adequado quando se utiliza o sólido fermentado de *R. microsporus*.

#### 5.4.2 Estudo de reutilização do sólido fermentado

A reutilização dos catalisadores é um importante fator que pode viabilizar o custo do processo enzimático. Neste trabalho, foi realizado um estudo de reutilização do sólido fermentado em reações de esterificação por sucessivos ciclos de 48 h, a  $40^\circ\text{C}$  (FIGURA 30).

Observa-se (FIGURA 30) que a conversão obtida no primeiro ciclo (58%) reduziu para 40% no segundo ciclo e ao final do quinto ciclo, a conversão obtida foi 21%, completando 240 h de tempo total de uso do sólido fermentado. Nestes ensaios, calculou-se a produção de éster em cada ciclo da reação de esterificação a partir da conversão obtida. A soma das massas de éster obtidas em cada ciclo mostrou que a reutilização possibilitou o aumento da produção de éster por g de sólido fermentado. No primeiro ciclo da reação, foram produzidos  $2,9 \text{ g}$  de éster por g de sólido fermentado ( $\text{g éster g}^{-1}\text{SS}$ ) e com as sucessivas reutilizações do sólido fermentado foi possível produzir, até o quinto ciclo,  $8,8 \text{ g éster g}^{-1}\text{SS}$ .

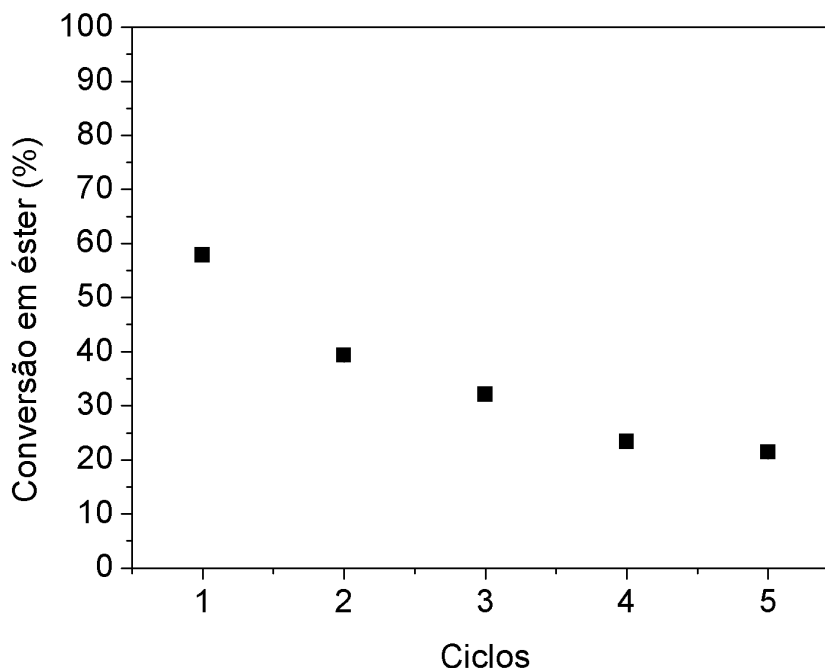


FIGURA 30 – REUTILIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO DE *Rhizopus microsporus* NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM BIORREATOR DE LEITO FIXO

Condições: 50 g de AGBS, 83 g de etanol (razão molar etanol: AGBS 10:1), 10,8 g sólido fermentado (base seca), vazão de recirculação 5 mL min<sup>-1</sup>, ciclos de 48 h.

Outros estudos sobre a reutilização de sólidos fermentados para reações de esterificação e transesterificação em leito fixo e em frascos agitados estão descritos na literatura (TABELA 15). O sólido fermentado de *B. cepacia* LTEB11 foi reutilizado por Soares et al. (2013) em ensaios de esterificação em sistema livre de solventes, em reator de leito fixo, com conversão de 92% mantida por 4 ciclos, diminuindo para 84% após 6 ciclos (288 h) de uso. A massa total de éster produzida foi de 64 g éster g<sup>-1</sup>SS. Liu et al. (2013) reutilizaram o sólido fermentado de *B. cenocepacia* para catalisar reações de transesterificação, em *tert*-butanol, em frascos agitados e obtiveram 71% de conversão no primeiro ciclo da reação, que diminuiu para 48% após 3 ciclos (288 h) de uso. Salum et al. (2010) reutilizaram o sólido fermentado de *B. cepacia* LTEB11 em reações de transesterificação em sistema livre de solventes em reator de leito fixo e obtiveram conversão de 95% no primeiro ciclo, mantida por 3 ciclos (141 h de uso), diminuindo para 62% após 282 h de uso (6 ciclos).

TABELA 15 – ESTUDOS DE REUTILIZAÇÃO DE SÓLIDOS FERMENTADOS

Micro-organismo produtor da lipase	Reação	Substratos	Condições	Duração do ciclo	Ciclo-conversão (tempo total de uso)	Referência
<i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM	esterificação	AGBS/ etanol	reator de leito fixo (40 °C)	48 h	1º - 58% (48 h) 2º - 39% (96 h) 5º - 21% (240 h)	Este trabalho
<i>Rhizopus icrosporus</i> CPQBA 312-07 DRM	esterificação	Ácido oleico/ etanol em <i>n</i> -heptano (96% V/V)	frascos agitados (200 rpm, 40 °C)	4 h	1º - 98% (4 h) 10º - 98% (40 h) 28º - 85% (112 h)	Este trabalho
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	transesterificação	óleo de soja / etanol em <i>terc</i> -butanol (40% V/V)	frascos agitados (200 rpm, 40 °C)	96 h	1º - 71% (96 h) 3º - 48% (288 h)	Liu et al. (2014)
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	esterificação	AGBS / etanol	reator de leito fixo (45 °C)	48 h	1º - 92% (48 h) 4º - 92% (192 h) 6º - 84% (288 h) 8º - 64% (384 h)	Soares et al. (2013)
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	transesterificação	óleo de soja / etanol	reator de leito fixo (50 °C)	47 h	1º - 95% (47 h) 3º - 95% (141 h) 6º - 62% (282 h) 9º - 50% (423 h)	Salum et al. (2010)
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	esterificação	Ácido oleico / etanol em <i>n</i> -heptano (96% V/V)	frascos agitados (200 rpm, 37 °C)	6 h	1º - 97% (6 h) 10º - 97% (60 h) 14º - 48% (84 h)	Fernandes et al. (2007)

O sólido fermentado com a *B. cepacia* LTEB11 apresentou maior estabilidade, visto que permite maior número de reutilizações com conversão de AGBS superior às obtidas pelo sólido fermentado de *R. microsporus* em sistema livre de solventes (TABELA 15).

Nos estudos de reutilização do sólido fermentado em reações de esterificação em presença de *n*-heptano deste trabalho e do estudo de Fernandes (2007), observou-se que a conversão obtida no primeiro ciclo da reação foi mantida por um número maior de ciclos quando comparado com o número de reutilizações da reação em sistema livre de solventes, obtido neste e nos outros trabalhos (TABELA 15).

#### 5.5. SIGNIFICÂNCIA DOS RESULTADOS DE SÍNTESE ENZIMÁTICA DE BIODIESEL OBTIDOS NESTE TRABALHO

Na literatura estão descritos estudos recentes de produção de biodiesel catalisada por sólidos fermentados de bactérias e fungos (TABELA 16).

Em sistema livre de solventes, fez-se uma importante comparação entre as produtividades das reações de esterificação e transesterificação, usando o mesmo sistema e sólido fermentado de *R. microsporus*.

No presente estudo, esterificação etílica da mistura de ácidos graxos da borra de soja, a produtividade foi 1,8 vezes maior do que a obtida por Zago et al. (2014) na etanólise do óleo de milho. Além disso, a conversão foi 1,3 vezes maior do que a obtida por Zago et al. (2014). Comparativamente, para o sólido fermentado de *B. cepacia* LTEB11, no estudo de Soares et al. (2013), esterificação etílica da mistura de ácidos graxos da borra de soja, foi obtida produtividade 1,8 vezes maior e a conversão foi 1,03 vezes menor do que a obtida por Salum et al. (2010) na etanólise do óleo de soja.

TABELA 16 – ESTUDOS RECENTES DE PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE ÉSTERES CATALISADA POR SÓLIDOS FERMENTADOS (CONTINUA)

	Micro-organismo produtor da lipase	Preparado Enzimático/ Suporte	Ácido graxo ou óleo/ Álcool	Solvente Sistema	Conversão Produtividade* (mg g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Referência
Esterificação	<i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM	bagaço de cana e solução nutriente	AGBS**/ etanol	livre (frascos agitados)	86%/48 h (102)	Este trabalho
	<i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM	bagaço de cana e solução nutriente	ácido oleico/ etanol	livre (frascos agitados)	98%/48 h (118)	Este trabalho
	<i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM	bagaço de cana e solução nutriente	AGBS**/ etanol	livre (reator de leite fixo)	58%/48 h (60)	Este trabalho
	<i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM	bagaço de cana e farelo de semente de girassol	ácido oleico/ etanol	<i>n</i> -heptano (frascos agitados)	98%/3 h (71)	Zago (2010)
	<i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM	bagaço de cana e farelo de semente de girassol	ácido oleico/ etanol	livre (reator de leite fixo)	12%/3 h (192)	Zago (2010)
	<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	bagaço de cana e farelo de semente de girassol	ácido oleico/etanol	<i>n</i> -hexano (frascos agitados)	92%/8 h (50)	Soares et al. (2013)
	<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	bagaço de cana e farelo de semente de girassol	ácido oleico/etanol	livre (frascos agitados)	82%/88 h (118)	Soares et al. (2013)
	<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	bagaço de cana e farelo de semente de girassol	AGBS**/etanol	livre (reator de leite fixo)	92%/31 h (272)	Soares et al. (2013)

TABELA 16 – ESTUDOS RECENTES DE PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE ÉSTERES CATALISADA POR SÓLIDOS FERMENTADOS (CONCLUSÃO)

	Micro-organismo produtor da lipase	Preparado Enzimático/ Suporte	Ácido graxo ou óleo/ Álcool	Solvente Sistema	Conversão Produtividade* (mg g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Referência
Transesterificação	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	bagaço de cana e farelo de semente de girassol	óleo de soja / etanol	<i>terc</i> -butanol (frascos agitados)	91%/96 h (87)	Liu et al. (2014)
	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	bagaço de cana e farelo de semente de girassol	óleo de soja / etanol	<i>terc</i> -butanol (frascos agitados)	86%/96 h (82)	Liu et al. (2013)
	<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	bagaço de cana e farelo de semente de girassol	óleo de soja / etanol	Livre (reator de leito fixo)	95%/46 h (152)	Salum et al. (2010)
	<i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM	bagaço de cana e farelo de semente de girassol	óleo de milho/ etanol	<i>n</i> -heptano (frascos agitados)	57%/120 h (50)	Zago (2010)
	<i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM	bagaço de cana e solução nutriente	óleo de milho/ etanol	Livre (frascos agitados)	68%/72 h (64)	Zago et al. (2014)

\*Produtividade em éster = massa de éster (mg) produzida por g de catalisador por h de reação (tempo da máxima conversão).

\*\*AGBS = ácidos graxos da borra de soja.

Tanto os estudos realizados com *R. microsporus* quanto os estudos com *B. cepacia* LTEB11 apresentaram maiores produtividades para as reações de esterificação quando comparadas com as reações de transesterificação (TABELA 16). Estes resultados corroboram os da literatura. De acordo com Soares et al. (2013), para os sistemas em que se utilizam sólidos fermentados como catalisadores, reações de esterificação são mais favoráveis devido a um problema inerente à transesterificação, já relatado por Salum et al. (2010). O glicerol fica aderido nas partículas do sólido dificultando a transferência de massa dos substratos, deixando a lipase inacessível aos substratos hidrofóbicos. Por isto, o uso de materiais de partida como a mistura de ácidos graxos de borras residuais em reações de esterificação é uma estratégia para aumentar a produtividade do sistema diminuindo o custo da produção enzimática de biodiesel.

Os resultados deste trabalho mostram que a otimização do processo de esterificação, em frascos agitados foi eficiente para ambos os materiais de partida utilizados, ácido oleico e mistura de ácidos graxos da borra de soja, sugerindo que os estudos devem ser continuados para aumentar a estabilidade do sólido fermentado e possibilitar a sua reutilização em vários ciclos reacionais.



## 6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, estudou-se a otimização do processo de síntese de ésteres em reações de esterificação de ácidos graxos catalisadas por sólido fermentado contendo lipases produzidas pelo fungo *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM.

Na primeira etapa, realizaram-se ensaios visando aumentar a atividade de hidrólise e de esterificação do sólido fermentado. Para isto, estudou-se um novo meio de cultivo de FES, substituindo o farelo de semente de girassol por um meio sintético composto por uréia, óleo de soja e uma solução nutriente de minerais e oligoelementos. O sólido fermentado liofilizado duplicou a atividade enzimática em relação a outro trabalho e manteve a sua estabilidade por 12 meses quando armazenado a -18 °C.

Nos estudos de esterificação etílica em presença do solvente *n*-heptano, altas conversões em éster (98%) foram obtidas. O sólido fermentado manteve a mesma conversão após ser reutilizado por 23 vezes na mesma reação.

Para as reações em sistema livre de solventes, o processo de síntese foi otimizado por delineamento fatorial, para dois materiais de partida diferentes: o ácido oleico e a mistura de ácidos graxos da borra de soja (AGBS). Verificou-se que a razão molar e a temperatura influenciam na conversão em éster para ambos materiais de partida, tendo-se obtido a máxima conversão, 98% para o ácido oleico e 86% para AGBS, nas condições razão molar 10:1 (etanol: AGBS) em 48 h, a 40 °C.

Os resultados obtidos em reações de esterificação etílica em frascos agitados foram superiores aos obtidos em biorreator de leito fixo empacotado com o sólido fermentado, com recirculação dos substratos, usando as mesmas condições. No biorreator de leito fixo obteve-se produtividade 41% menor e conversão 34% menor do que os obtidos em frascos agitados.

No estudo em biorreator de leito fixo em sistema livre de solventes, o sólido fermentado foi reutilizado. A conversão obtida no primeiro ciclo (58%) reduziu para 40% no segundo ciclo e ao final do quinto ciclo, a conversão obtida foi 21%, completando 240 h de tempo total de uso do sólido fermentado.

Comparado ao processo de transesterificação, catalisado pelo sólido fermentado de *R. microsporus*, o processo de esterificação proposto neste trabalho possibilitou um aumento da produtividade em éster.

O conjunto de características apresentadas demonstram o potencial do sólido fermentado por *R. microsporus* de aplicação na síntese enzimática de biodiesel. Entretanto, os resultados sugerem que mais estudos devem ser realizados no sentido de aumentar a estabilidade do sólido fermentado e possibilitar a sua reutilização em vários ciclos reacionais. Este biocatalisador, além de ser eficiente, pode minimizar os custos de produção das lipases para aplicação na produção de biodiesel. Além disso, a hidroesterificação de materiais graxos residuais, isto é, a hidrólise de materiais graxos seguida de reações de esterificação, como ácidos graxos obtidos da borra de soja, pode ser uma alternativa promissora para o processo tradicional de produção de biodiesel por transesterificação alcalina utilizado industrialmente.

## 7 PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, são verificados pontos a serem estudados para propiciar o pleno desenvolvimento da aplicação do sólido fermentado de *R. microsporus* na síntese de biodiesel, dentre eles:

- Ampliação da escala de produção de ésteres etílicos em reator de batelada tipo tanque agitado (STR) que pode ser mais adequado quando se utiliza o sólido fermentado de *R. microsporus*;
- Estudos de aumento de estabilidade do sólido fermentado no meio reacional de síntese, para possibilitar a sua reutilização em ciclos reacionais sucessivos;
- Utilização de outros materiais de partida para a síntese de biodiesel que sejam subprodutos industriais ou comerciais, como borras contendo altos teores de ácidos graxos e óleos de frituras usados, por exemplo, uma vez que o processo de esterificação apresentou produtividades significativamente maiores que aquelas publicadas na literatura para o processo de transesterificação;
- Desenvolvimento de uma metodologia de recuperação dos produtos finais incluindo: reaproveitamento do sólido fermentado para novos cultivos de FES, purificação do biodiesel, recuperação e reciclo do etanol;
- Estudo da viabilidade econômica do processo, incluindo custos da FES, matéria-prima, purificação do biodiesel, recuperação e reciclo do etanol.

## REFERÊNCIAS

ADACHI, D.; HAMA, S.; NAKASHIMA, K.; BOGAKI, T.; OGINO, C.; KONDO, A. Production of biodiesel from plant oil hydrolysates using an *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalyst highly expressing *Candida antarctica* lipase B. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 410-416, 2013.

AGUIEIRAS, E.C.G.; CAVALCANTI, E.D.C.; CASTRO, A.M.; LANGONE, M.A.P.; FREIRE, D.M.G. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. **Fuel**, v. 135, p. 315-321, 2014.

AKOH, C.C.; CHANG, S.W.; LEE, G.C.; SHAW, J.F. Enzymatic approach to biodiesel production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8995-9005, 2007.

ALBERTON, D.; MITCHELL, D.A.; CORDOVA, J.; ZAMORA, P.P.; KRIEGER, N. Production of a fermented solid containing lipases of *Rhizopus microsporus* and its application in the pre-hydrolysis of a high-fat dairy wastewater. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, p. 28-35, 2010.

AL-ZUHAIR, S.; LIG, F.W.; JUN, L.S. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 951-960, 2007.

ANTCZAK, M.S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis-Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1185-1194, 2009.

AOAC INTERNATIONAL. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 18 ed. Gaithersburg. AOAC International, 2005.

ATADASHI, I.M.; AROUA, M.K.; ABDUL, A.A.R.; SULAIMAN, N.M.N. The effects of water on biodiesel production and refining technologies: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 3456-3470, 2012.

BALAT, M. Potential alternatives to edible oils for biodiesel production: a review of current work. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 1479-1492, 2011.

BALCÃO, V.M.; PAIVA, A.L.; MALCATA, F.X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 392-416, 1996.

BANKOVIC-ILIC, I.B.; STAMENKOVIC, O.S.; VELJKOVIC, V.B. Biodiesel production from non-edible plant oils. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 3621-3647, 2012.

BARON, A.M.; ZAGO, E.C.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. SPIL: Simultaneous production and immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 29, p. 19-24, 2011.

BARON, A.M.; BAROUH, N.; BAREA, B.; VILLENEUVE, P.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Transesterification of castor oil in a solvent-free medium using the lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11 immobilized on a hydrophobic support. **Fuel**, v. 117, p. 458-462, 2014.

BORNSCHEUER, U.T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 73-81, 2002.

BOTTON, V.; RIVA, D.; SIMIONATTO, E.L.; WIGGERS, V.R.; ENDER, L.; MEIER, H.F.; BARROS, A.A.C. Craqueamento termo-catalítico da mistura óleo de fritura usado-lodo de estamparia têxtil para a produção de óleo com baixo índice de acidez. **Química Nova**, v. 35, p. 677-682, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360 de 23 de dezembro de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 26 de dez. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e B combustíveis – ANP: Lei n. 11.097, de 13 de janeiro de 2005. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 2005.

BRASIL. Conselho Nacional de Política Energética – CNPE: Resolução n. 6, de 16 de setembro de 2009. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP: Boletim mensal do biodiesel, de fevereiro de 2014. Disponível em: <http://www.anp.gov.br>. Acesso em: 20 de fev. 2014.

BRASIL, Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e B combustíveis – ANP: Medida Provisória n. 647, de 28 de maio de 2014. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP: Resolução nº 45, de 25 de agosto de 2014. Disponível em: <http://www.anp.gov.br>. Acesso em: 20 de out. 2014.

BRUNS, R.E.; BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. 2ª ed. Campinas: Unicamp, 2001.

CASTILHO, L.R.; POLATO, C.M.S.; BARUQUE, E.A.; SANT'ANNA JR., G.L.; FREIRE, D. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p. 239-247, 2000.

CAVALCANTI-OLIVEIRA, E.D.; SILVA, P.R.; RAMOS, A.P.; ARANDA, D.A.G.; FREIRE, D.M.G. Study of soybean oil hydrolysis catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase and its application to biodiesel production via hydroesterification. **Enzyme Research**, v. 2011, p.1-8, 2010.

CHEN, H.C.; JU, H.Y.; WU, T.T.; LIU, Y.C.; LEE, C.C.; CHANG, C.; CHUNG, Y. L.; SHIEH, C.J. Continuous production of lipase-catalyzed biodiesel in a packed-bed reactor: Optimization and enzyme reuse study. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1-6, 2011.

CHRISTOPHER, L.P.; KUMAR, H.; ZAMBARE, V.P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, p. 497-520, 2014.

CIUDAD, G.; REYES, I.; JORQUERA, M.A.; AZÓCAR, L.; WICK, L.Y.; NAVIA, R. Novel three-phase bioreactor concept for fatty acid alkyl ester production using *R. oryzae* as whole cell catalyst. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 2505-2512, 2011.

COONEY, G.D.; EMERSON R. **Thermophilic fungi**. San Francisco, London: W. H. Freeman and Company, 1964.

CORDEIRO, C.S.; SILVA, F.R.; WYPYCH, F.; RAMOS, L.P. Catalisadores heterogêneos para a produção de monoésteres graxos (biodiesel). **Química Nova**, v. 34, p. 477-486, 2011.

COUTO, S.R.; SANROMAN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 291-302, 2006.

CYGLER, M.; SCHRAG, J.D. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. **Methods in Enzymology**, v. 284, p. 3-27, 1997.

DIAZ, J.C.M. **Novos instrumentos para a biocatálise: Rastreamento, Purificação e Caracterização de lipases fúngicas termofílicas**. França, 2005. 190p. Tese (Doutorado) – Universidade de la Mediterranee Aix-Marseille II.

DIAZ, J.C.M.; RODRÍGUEZ, J.A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedure. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p.1042-1050, 2006.

DIYOROV, J.K.; LUSTA, K.A.; TSIOMENKO, A.B.; KULAEV, I.S. Molecular forms of lipases and their localization in the fungus *Rhizopus microsporus* by immunoelectron microscopy. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 10, p. 367-373, 1994.

ESSAMRI, M.; DEYRIS, V.; COMEAU, L. Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. **Journal of Biotechnology**, v. 60, p. 97-103, 1998.

EUROPEAN STANDARD **EN 14103: 2003**: Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents. European Committee for Standardization, 2003.

FABER, K. **Biotransformation in Organic Chemistry**. 6<sup>a</sup>. ed. Springer, 2011.

FERNANDES, M.L.M.; SAAD, E.B.; MEIRA, J.A.; RAMOS, L.P.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalyzed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 263, p. 8-13, 2007.

FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K.V.; NORDDAHL, B. A Review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, p. 1298-1315, 2009.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF UNITED NATIONS.  
Disponível em: <http://www.faostat.fao.org>. Acesso em: 15 de jul. 2013.

FORESTI, M.L.; ALIMENTI, G.A.; FERREIRA, M.L. Interfacial activation and bioimprinting of *Candida rugosa* lipase immobilized on polypropylene: effect on the enzymatic activity in solvent-free ethyl oleate synthesis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 338-349, 2005.

FORESTI, M.L.; FERREIRA, M.L. Solvent-free ethyl oleate synthesis mediated by lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on polypropylene powder. **Catalysis Today**, v. 107-108, p. 23-30, 2005.

FORESTI, M. L.; PERDENERA, M.; BUCALÁ, V.; FERREIRA, M. L. Multiple effects of water on solvent-free enzymatic esterifications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 62-70, 2007.

FREEDMAN, B.; PRYDE, E.H.; MOUNTS, T.L. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 61, p. 1638-1643, 1984.

FUKUDA, H.; KONDO, S.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, p. 405-416, 2001.

GARLAPATI, V.K.; BANERJEE, R. Optimization of lipase production using differential evolution. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, p. 254-260, 2010.

GHAMGUI, H.; KARRA-CHAABOUNI, M.; GARGOURI, Y. 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between *n*-hexane and solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 355-363, 2004.

GIAKOUMIS, E.G. A statistical investigation of biodiesel physical and chemical properties, and their correlation with the degree of unsaturation: a review. **Renewable Energy**, v. 50, p. 858-878, 2013.

GIRALDO, L.; MORENO-PIRAJÁN, J.C. Lipase supported on mesoporous materials as a catalyst in the synthesis of biodiesel from *Persea americana* mill oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 77, p. 32-38, 2012.



GIRALDO, L.J.L.; LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; FIGUEROA-ESPINOZA, M.C.; BAROUH, N.; BAREA, B.; VILLENEUVE, P. Lipase-catalyzed synthesis of chlorogenate fatty esters in solvent-free medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 721-726, 2007.

GOG, A.; ROMAN, M.; TOS, M.; PAIZS, C.; IRIMIE, F.D. Biodiesel production using enzymatic transesterification e Current state and perspectives. **Renewable Energy**, v. 39, p. 10-16, 2012.

GRYGLEWICZ, S.; MUSZYNSKI, M.; NOWICKI, J. Enzymatic synthesis of rapeseed oil-based lubricants. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 25- 29, 2013.

GUERRERO, F.C.A.; GUERRERO-ROMERO, A.; SIERRA, F.E. Biodiesel production from waste cooking. In: Margarita Stoytcheva e Gisela Montero (Org.) **Biodiesel – Feedstocks and Processing Technologies**. 2011.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p.763-781, 2004.

HAAS, M.J.; BLOOMER, S.; SCOTT, K. Simple, high-efficiency synthesis of fatty acid methyl esters from soapstock. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 77, p. 373-379, 2000.

HAAS, M.J.; MICHALSKI, S.; RUNYON, S.; NUNEZ, A.; SCOTT, K.M. Production of FAME from acid oil, a by-product of vegetable oil refining. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 80, p. 97-102, 2003.

HAAS, M.J. Improving the economics of biodiesel production through the use of low value lipids as feedstocks: vegetable oil soapstock. **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 1087-1096, 2005.

HALLING, P.J. Effects of water on equilibria catalysed by hydrolytic enzymes in biphasic reaction systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 6, p. 513-516, 1984.

HALLING, P.J. High affinity bindings of water by proteins is similar in air and in organic solvents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1040, p. 225-228, 1990.

HAMA, S.; YAMAJI, H.; FUKUMIZU, T.; NUMATA, T.; TAMALAMPUDI, S.; KONDO, A.; NODA, H.; FUKUDA, H. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 273-278, 2007.

HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; YOSHIDA, A.; TAMADANI, N.; KURATANI, N.; NODA, H.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Enzymatic packed-bed reactor integrated with glycerol-separating system for solvent-free production of biodiesel fuel. **Biochemical Engineering Journal**, v. 55, p. 66-71, 2011.

HAMA, S.; KONDO, A. Enzymatic biodiesel production: An overview of potential feedstocks and process development. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 386-395, 2013.

HAN, M.; YI, W.; WU, Q.; LIU, Y.; HONG, Y.; WANG, D. Preparation of biodiesel from waste oils catalyzed by a Brønsted acidic ionic liquid. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2308-2310, 2009.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, B.; CÓRDOVA, J.; BÁRZANA, E.; FAVELATORRES, E. Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by thermotolerant fungi in solid-state fermentation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 61, p. 136-142, 2009.

HIOL, A.; JONZO, M.D.; RUGANI, N.; DRUET, D.; SARDA, L.; COMEAU, L.C. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 421-430, 2000.

HUANG, D.; HAN, S.; HAN, Z.; LIN, Y. Biodiesel production catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase-displaying *Pichia pastoris* whole cells in an isooctane system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 63, p. 10-14, 2012.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo. Instituto Adolfo Lutz, 2005.

ISAYAMA, Y.; SAKA, S. Biodiesel production by supercritical process with crude bio-methanol prepared by wood gasification. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4775-4779, 2008.

JAEGER, K.E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B.W.; COLSON, C.; VANHEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **Fems Microbiology Reviews**, v. 15, p. 29-63, 1994.

JAEGER, K.E.; REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 396-403, 1998.

JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K.E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 390-397, 2002.

JANAUN, J., ELLIS, N. Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 1312-1320, 2010.

JENSEN, R.G.; GALLUZZO, D.R.; BUSH, V.J. Selectivity is an important characteristic of lipases (acylglycerol hydrolases). **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 3, p. 307-316, 1990.

KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, p. 12-15, 2001.

KITPREECHAVANICH, V.; MANEEBOON, T.; KAYANO, Y.; SAKAI, K. Comparative characterization of L-lactic acid-producing thermotolerant *Rhizopus* fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 106, p. 541-546, 2008.

KNOTHE, G.; GERPEN, J.V., KRAHL, J., RAMOS, L.P. **Manual de Biodiesel**. São Paulo: Edgard Blücher, 2006.

KODA, R.; NUMATA, T.; HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; NAKASHIMA, K.; TANAKA, T.; OGINO, C.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Ethanolysis of rapeseed oil to produce biodiesel fuel catalyzed by *Fusarium heterosporum* lipase-expressing fungus immobilized whole-cell biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 101-104, 2010.

KORMAN, T.P.; SAHACHARTSIRI, B.; CHARBONNEAU, D.M.; HUANG, G.L.; BEAUREGARD, M.; BOWIE, J.U. Dieselzymes: development of a stable and methanol tolerant lipase for biodiesel production by directed evolution. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 70, 2013.

KRIEGER, N.; BHATGNAR, T.; BARATTI, J.C.; BARON, A.M.; LIMA, V.M.; MITCHELL, D. Non-Aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, p. 279-286, 2004.

KRISHNA, S.H.; KARANTH, N.G. Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. **Catalysis Reviews-Science and Engineering**, v. 44, p. 499-591, 2002.

KUCEK, K.T.; CÉSAR-OLIVEIRA, M.A.F.; WILHELM, H.M.; RAMOS, L.P. Ethanolysis of refined soybean oil assisted by sodium And potassium hydroxides. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, p. 385-392, 2007.

LAANE, S.; BOEREN, K.V.; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 30, p. 81-87, 1987.

LANE, J. Biodiesel 2.0 the next chapter for America's favorite advanced biofuel. Disponível em: <http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2014/01/20/biodiesel-2-0-the-next-chapter-for-americas-favorite-advanced-biofuel/>. Acesso em: 21 de fev. 2014.

LAUDANI, C.G.; HABULIN, M.; KNEZ, Z.; DELLA PORTA, G.; REVERCHON, E. Immobilized lipase-mediated long-chain fatty acid esterification in dense carbon dioxide: bench-scale packed-bed reactor study. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 41, p. 74-81, 2007.

LEE, C.H.; LIN, T.S.; MOU, C.Y. Mesoporous materials for encapsulating enzymes. **Nano Today**, v. 4, p. 165-179, 2009.

LEE, J.H.; KIM, S.B.; KANG, S.W.; SONG, Y.Y.; PARK, C.; HAN, S.O.; KIM, S.W. Biodiesel production by a mixture of *Candida rugosa* and *Rhizopus oryzae* lipases using a supercritical carbon dioxide process. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2105-2108, 2011.

LI, A.; NGO, T.P.N.; YAN, J.; TIAN, K.; LI, Z. Whole-cell based solvent-free system for one-pot production of biodiesel from waste grease. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 725-729, 2012.

LI, X.; XU, H.; WU, Q. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, p. 764-771, 2007.

LINKO, Y.Y.; LAMSA, M.; HUHTALA, A.; RANTANEN, O. Lipase Biocatalysis in the Production of Esters. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, p. 1293-1299, 1995.

LIU, C.H.; HUANG, C.C.; WANG, Y.W.; LEE, D.J.; CHANG, J.S. Biodiesel production by enzymatic transesterification catalyzed by Burkholderia lipase immobilized on hydrophobic magnetic particles. **Applied Energy**, v. 100, p. 41-46, 2012.

LIU, Y.; CHEN, D.; YAN, Y.; PENG, C.; XU, L. Biodiesel synthesis and conformation of lipase from Burkholderia cepacia in room temperature ionic liquids and organic solvents. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10414-10418, 2011.

LIU, Y.; LI, C.; MENG, X.; YAN, Y. Biodiesel synthesis directly catalyzed by the fermented solid of *Burkholderia cenocepacia* via solid state fermentation. **Fuel Processing Technology**, v. 106, p. 303-309, 2013.

LIU, Y.; LI, C.; WANG, S.; CHEN, W. Solid-supported microorganism of *Burkholderia cenocepacia* cultured via solid state fermentation for biodiesel production: Optimization and kinetics. **Applied Energy**, v. 113, p. 713-721, 2014.

LOWRY, R.R.; TINSLEY, J.I. Rapid colorimetric determination of free acids. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v. 53, p. 470-472, 1976.

MA, F.; HANNA, M.A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 1-15, 1999.

MADALOZZO, A. D. **Síntese de ésteres etílicos utilizando uma lipase recombinante de *Rhizopus oryzae***. Curitiba, 2011. 149p. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) - Departamento de Ciências-Bioquímica, Universidade Federal do Paraná.

MADALOZZO, A.D.; MUNIZ, L.S.; BARON, A.M.; PIOVAN, L.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Characterization of an immobilized recombinant lipase from *Rhizopus oryzae*: Synthesis of ethyl-oleate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 13-19, 2014.

MALILAS, W.; KANG, S.W.; KIM, S.B.; YOO, H.Y. CHULALAKSANANUKUL, W.; KIM, S.W. Lipase from *Penicillium camembertii* KCCM 11268: Optimization of solid state fermentation and application to biodiesel production. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 30, p. 405-412, 2013.

MARCHETTI, J.M.; MIGUEL, V.U.; ERRAZU, A.F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 11, p. 1300-1311, 2007.

MARTÍNEZ-RUIZ, A.; GARCÍA, H.S.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; FAVELATORRES, E. Organic phase synthesis of ethyl oleate using lipases produced by solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, p. 393-401, 2008.

MATH, M.C.; KUMAR, S.P.; CHETTY, S.V. Technologies for biodiesel production from used cooking oil: A review. **Energy for Sustainable Development**, v. 14, p. 339-345, 2010.

MATSUMOTO, T.; TAKAHASHI, S.; KAIEDA, M.; UEDA, M.; TANAKA, A.; FUKUDA, H. KONDO, A. Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 57, p. 515-520, 2001.

MEHER, D.L.C.; SAGAR, V.; NAIK, S.N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10, p. 248-268, 2006.

MEIER, H.F.; WIGGERS, V.R.; ZONTA, G.R.; SCHARF, D.R.; SIMIONATTO, E.L.; ENDER, L. A kinetic model for thermal cracking of waste cooking oil based on chemical lumps. **Fuel**, v. 144, p. 50-59, 2015.

MENG, Y.; WANG, G.; YANG, N.; ZHOU, Z.; JUAN, Y.; LIANG, X.; CHEN, J.; LI, Y.; LI, J. Two-step synthesis of fatty acid ethyl ester from soybean oil catalyzed by *Yarrowia lipolytica* lipase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 1-9, 2011.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Overview of Solid State Bioprocessing. **Biotechnology Annual Review**, v. 8, p. 183-225, 2002.

MITCHELL, D.A.; VON MEIEN, O.F.; KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 137-147, 2003.

MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. **Solid-State Fermentation Bioreactors**. Heidelberg: Springer. 2006.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N. **The bioreactor step of SSF: A complex interaction of phenomena**. In: MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, p. 13-32, Heidelberg: Springer, 2006.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais**. São Paulo: Varela, 1998.

MOSER, B.R. Biodiesel production, properties, and feedstocks: a review. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 45, p. 229-266, 2009.

NAGY, V.; TOKE, E.R.; KEONG, L.C.; SZATZKER, G.; IBRAHIM, D.; OMAR, I.C.; SZAKACS, G.; POPPE, L. Kinetic resolutions with novel, highly enantioselective fungal lipases produced by solid state fermentation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 141-148, 2006.

NIELSEN, P.M.; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, p. 692-700, 2008.

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R.S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 769-777, 2005.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, p. 149-162, 1999.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.

PAZOUKI, M.; ZAMANI, F.; ZAMZAMIAN, A.H.; FAHAR, M.; NAJAFPOUR, G. Esterification of Free Fatty Acids by *Rhizopus oryzae* as Cell-Catalyzed from Used Cooking Oil for Biodiesel Production. **World Applied Sciences Journal**, v. 6, p. 719-724, 2010.

PEREIRA, R.G.; OLIVEIRA, C.D.; OLIVEIRA, J.L.; OLIVEIRA, P.C.P.; FELLOWS, C.E.; PIAMBA, O.E. Exhaust emissions and electric energy generation in a stationary engine using blends of diesel and soybean biodiesel. **Renewable Energy**, v. 32, p. 2453-2460, 2007.

PIEDMONT BIOFUELS. Enzymatic biodiesel. Disponível em: <http://http://www.biofuels.coop/enzymatic-biodiesel>. Acesso em: 30 de ag. 2014.

POUDEROYEN, G.; EGGERT, T.; JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal  $\alpha/\beta$  hydrolase fold enzyme. **Journal of Molecular Biology**, v. 309, p. 215-226, 2001.

QIN, H.; YAN, X.; YUN, T.; DONG, W. Biodiesel production catalyzed by whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis*. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 29, p. 41-46, 2008.

RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. **European Journal Applied Microbiology Biotechnology**, v. 9, p. 199-209, 1980.

RASERA, K.; OSÓRIO, N.M.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; FERREIRA-DIAS, S. Interesterification of fat blends using a fermented solid with lipolytic activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 76, p. 75-81, 2012.

REN, H.; DU, W.; LV, L.; LIU, D. Study on free lipase-catalyzed ethanolysis for biodiesel preparation in an oil/water biphasic system. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, p. 1551-1555, 2011.

REN, H.; LI, Y.; DU, W.; LIU, D. Free lipase-catalyzed esterification of oleic acid for fatty acid ethyl ester preparation with response surface optimization. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 90, p. 73-79, 2013.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. Disponível em: <http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production>. Acesso em: 15 de jun. 2013.

RAHMAN, M.B.A.; TAJUDIN, S.M.; HUSSEIN, M.Z.; RAHMAN, R.N.Z.R.A.; SALLEH, A.B.M.B. Application of natural kaolin as support for the immobilization of lipase from *Candida rugosa* as biocatalyst for effective esterification. **Applied Clay Science**, v. 29, p.111-116, 2005.



RODRIGUEZ, J.A.; MATEOS, J.C.; NUNGARAY, J.; GONZÁLEZ, V.; BHAGNAGAR, T.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI, J. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2264-2269, 2006.

RODRIGUES, R.C.; PESSELA, B.C.C.; VOLPATO, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J.M.; AYUB, M.A.Z. Two step ethanolysis: A simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilized–stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1268-1273, 2010.

SALIHU, A.; ZAHANGIR, A.M.; ABDULKARIM, M.I.; SALLEH, H.M. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues: A Review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 58, p. 36-44, 2012.

SALIMON, J.; SALIH, N.; YOUSIF, E. Biolubricant basestocks from chemically modified ricinoleic acid. **Journal of King Saud University – Science**, v. 24, p. 11-17, 2012.

SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 119, p. 291-299, 2005.

SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Comparison among immobilized lipases o macroporus polypropylene toward biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 54, p. 19-26, 2008.

SALUM, T. F.C. **Produção e imobilização de lipases para utilização em síntese de ésteres**. Curitiba, 2010. 167p. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) - Departamento de Ciências-Bioquímica, Universidade Federal do Paraná.

SALUM, T.F.C.; VILLENEUVE, P.; BAREA, B.; YAMAMOTO, C.I.; CÔCCO, L.C.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1348-1354, 2010.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, p. 133-142, 2002.

SCHIPPER, M.A.A. A reversion of genus *Rhizopus*. 1. The *Rhizopus stolonifer* group and *Rhizopus oryzae*. **Studies Mycology**, v. 25, p. 1-19, 1984.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R.M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, p. 199-210, 1998.

SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 2009.

SLIVINSKI, C. T. **Produção de surfactina por *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 em fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana e okara como substrato**. Curitiba, 2012. 144p. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) – Departamento de Ciências-Bioquímica, Universidade Federal do Paraná.

SOARES, D.; MADALOZZO, A.D.; BOTTON, V.; MARTINI, V.P.; KRIEGER, N. Biocatálise com lipases em solventes orgânicos. In: Regina Aparecida Correia Gonçalves; Arildo José Braz de Oliveira; José Eduardo Gonçalves. (Org.). **Biocatálise e Biotransformação: Fundamentos e Aplicações**. 1ª ed. São Paulo: Schoba, v. 2, p. 247-280, 2012.

SOARES, D.; PINTO, A.F.; GONÇALVES, A.G.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 15-23, 2013.

SOARES, D. **Desenvolvimento do processo de esterificação etílica enzimática de ácidos graxos em reator de leito fixo**. Curitiba, 2014. 156p. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) – Departamento de Ciências-Bioquímica, Universidade Federal do Paraná.

SOTOFT, L.F.; RONG, B.G.; CHRISTENSEN, K.V.; NORDDAHL, B. Process simulation and economical evaluation of enzymatic biodiesel production plant. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5266-5274, 2010.

STAMENKOVIC, O.S.; VELICKOVIC', A.V.; VELJKOVIC, V.B. The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: Current state and perspectives. **Fuel**, v. 90, p. 3141-3155, 2011.

STRAATHOF, A.J.J.; ADLERCREUTZ, P. **Applied biocatalysis**. 2ª ed. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 2000.

SUN, S.Y.; XU, Y. Membrane-bound 'synthetic lipase' specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by *Rhizopus chinensis*: A comparative investigation **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1336-1342, 2009.

SUN, S.Y.; XU, Y.; WANG, D. Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation: Biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2607-2612, 2009.

SUN, T.; DU, W.; ZENG, J.; DAI, L.; LIU, D. Exploring the effects of oil inducer on whole cell-mediated methanolysis for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 514-518, 2010.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 628-634, 2010.

TAN, T.; SHANG, F.; ZHANG, X. Current development of biorefinery in China. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 543-555, 2010.

TISS, A.; CARRIERE, F.; VERGER, R. Effects of Arabic gum on interfacial lipases binding and activity. **Analytical Biochemistry**, v. 294, p. 36-43, 2001.

VAN GERPEN, J.; SHANKS, B.; PRUSZKO, R.; CLEMENTS, D.; KNOTHE, G. Biodiesel production technology. NREL/SR-510-36244. Colorado: **National Renewable Energy Laboratory**, 2004.

VÉRAS, I.C.; SILVA, F.A.L.; FERRÃO-GONZALES, A.D.; MOREAU, V.H. One-step enzymatic production of fatty acid ethyl ester from high-acidity waste feedstocks in solvent-free media. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9653-9658, 2011.

WANG, X.Q.; LIU, X.; ZHAO, C.; DING, Y.; XU, P. Biodiesel production in packed-bed reactors using lipase-nanoparticle biocomposite. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6352-6355, 2011.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, p. 703-707, 2001.

WATANABE, Y.; NAGAO, T.; NISHIDA, Y.; TAKAGI, Y.; SHIMADA, Y. Enzymatic production of fatty acid methyl esters by hydrolysis of acid oil followed by esterification. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, p. 1015-1021, 2007.

YADAV, G.D.; DEVI, K.M. Immobilized lipase-catalysed esterification and transesterification reactions in non-aqueous media for the synthesis of tetrahydrofurfuryl butyrate: comparison and kinetic modeling. **Chemical Engineering Science**, v. 59, p. 373-383, 2004.

YAN, J.; ZHENG, X.; LI, S. A novel and robust recombinant *Pichia pastoris* yeast whole cell biocatalyst with intracellular overexpression of a *Thermomyces lanuginosus* lipase: Preparation, characterization and application in biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 43-48, 2014.

YAN, Y.; LI, X.; WANG, G.; GUI, X.; LI, G.; SU, F.; WANG, X.; LIU, T. Biotechnological preparation of biodiesel and its high-valued derivatives: A review. **Applied Energy**, v. 113, p. 1614-1631, 2014.

YOSHIDA, A.; HAMA, S.; TAMADANI, N.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Improved performance of a packed-bed reactor for biodiesel production through whole-cell biocatalysis employing a high-lipase-expression system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 63, p. 76-80, 2012.

YÜCEL, Y. Optimization of biocatalytic biodiesel production from pomace oil using response surface methodology. **Fuel Processing Technology**, v. 99, p. 97-102, 2012.

ZAGO, E.C. **Síntese de ésteres etílicos empregando lipases de *Rhizopus microsporus* produzidas por fermentação no estado sólido**. Curitiba, 2010. 127p. Dissertação (Mestrado em Química) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

ZAGO, E.; BOTTON, V.; ALBERTON, D.; CÓRDOVA, J.; YAMAMOTO, C.I.; CÔCCO, L.C.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Synthesis of ethylic esters for biodiesel purposes using lipases naturally immobilized in a fermented solid produced using *Rhizopus microsporus*. **Energy Fuels**, v. 28, p. 5197-5203, 2014.

ZAKS, A.; KLIBANOV, M.A. The effect of water on enzyme action in organic media. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 8017-8021, 1988.

ZAWADZKI, R.A.F.O.; PRADO, M.R.; MITCHELL, D.A.; NADIA, N. Continuous enzymatic pre-hydrolysis treatment for high-fat wastewater. **Food Technology and Biotechnology**, v. 51, p. 293-300, 2013.

ZHANG, L.; XIAN, M.; HE, Y.; LI, L.; YANG, J.; YU, S.; XU, X. A Brønsted acidic ionic liquid as an efficient and environmentally benign catalyst for biodiesel synthesis from free fatty acids and alcohols. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4368-4373, 2009.

ZHANG, Y.; DUBÉ, M.; MCLEAN, D.; KATES, M. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 1-16, 2003.

ZHONG, H.; FANG, Z.; ZOU, B.; LI, X.; OUYANGA, P.; GUO, K. Studies on the lipase-catalyzed esterification of alkyl oleates in solvent-free systems. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 114-117, 2013.